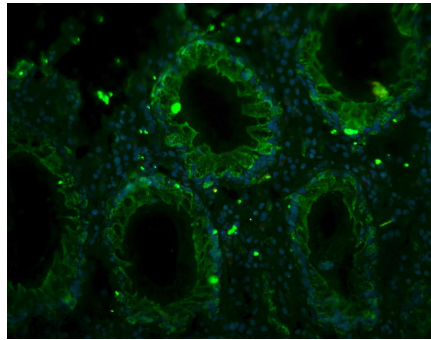


**Korrelation von *Mycobacterium avium* subspezies
paratuberculosis (MAP) Infektion
mit der Expression von
Matrix-Metalloproteinasen
und Toll-like-Rezeptoren
im murinen Kolon**



Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades des
Doktors der Humanbiologie (Dr. biol. hom.)
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Arzu Koc
aus Kassel /Hessen
Gießen, November 2016

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Schwerpunkt Gastroenterologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiterin: Univ.-Prof. Dr. med. Elke Roeb, MA

1. Gutachterin: Prof. Dr. med. Elke Roeb MA

2. Gutachter: Prof. Dr. E. Domann

Tag der Disputation: 18.07.2017

Teile der vorliegenden Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:

Originalarbeiten

Koc A, Bargaen I, Suwandi A, Roderfeld M, Tschuschner A, Rath T, et al. Systemic and Mucosal Immune Reactivity upon Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis Infection in Mice. PLoS One 2014;9(4):e94624.

Roderfeld M, Koc A, Rath T, Blocher S, Tschuschner A, Akineden O, et al. Induction of matrix metalloproteinases and TLR2 and 6 in murine colon after oral exposure to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. Microbes Infect 2012 Jun;14(6):545-553.

Abstracts

Arzu Koc, Martin Roderfeld, Timo Rath, Imke Bargaen, Siegfried Weiß, Elke Roeb. Eine Infektion mit Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in T-Zell rekonstituierten Rag2^{-/-} Mäusen stimuliert die Expression von Matrix Metalloproteinasen und TLR-6 im Colon. Internist 2011. S1:1–173 (27).

Arzu Koc, Martin Roderfeld, Timo Rath, Sonja Blöcher, Annette Tschuschner, Johanna Pott, Tina Basler, Ömer Akineden, Amir Abdulmawjoo, Susanne von Gerlach, Ralph Goethe, Matthias Hornef, Michael Bülte, Elke Roeb. Verstärkte Expression von Matrix Metalloproteinasen in murinen Colon nach oraler Infektion mit Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (MAP). Z Gastroenterol 2011; 49 - P148 (1094)

Arzu Koc, Martin Roderfeld, Timo Rath, Annette Tschuschner, Imke Bargaen, Siegfried Weiß, Elke Roeb. Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (MAP) führt zu T-Zell abhängiger Expressionssteigerung von Matrix Metalloproteinasen und Toll-like-Rezeptoren im murinen Kolon. Z Gastroenterol 2012; 50 - V09 (797)

Arzu Koc, Imke Bargaen, Martin Roderfeld, Timo Rath, Gerald F. Gerlach, Siegfried Weiss², Elke Roeb. The induction of Matrix Metalloproteinases and TLRs in murine colon by Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis depends on T-cells. Journal of Physiology and Biochemistry. Sep. 2013, Volume 69, Issue 3, pp 653-675

Arzu Koc, Imke Bargaen, Timo Rath, Martin Roderfeld, Tina Basler, Ralph Goethe, Gerald F. Gerlach, Siegfried Weiss, Elke Roeb. Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (MAP) reguliert die MMP- 13 Expression in NK-Zellen des murinen Kolons. Z Gastroenterol 2013; 51 - K37 (878)

Meiner FAMILIE und FREUNDEN

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Inhaltsverzeichnis..... | v |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1. <i>Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis</i> | 2 |
| 1.1.1 Gattung Mycobacterium..... | 2 |
| 1.1.2 Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (MAP) | 4 |
| 1.1.3 John's disease - Paratuberkulose | 5 |
| 1.1.4 Pathologie und Immunologie | 6 |
| 1.1.5 Tiermodelle zur Infektion von MAP | 11 |
| 1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen..... | 13 |
| 1.2.1 Morbus Crohn und Colitis ulcerosa | 13 |
| 1.2.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen und MAP..... | 15 |
| 1.3 Toll-like-Rezeptoren..... | 16 |
| 1.4 Matrix-Metalloproteinasen..... | 19 |
| 1.4.1 Regulation der Matrix-Metalloproteinasen | 23 |
| 1.4.2 Matrix-Metalloproteinasen und entzündliche Darmerkrankungen..... | 25 |
| 1.4.3 Untersuchte Matrix-Metalloproteinasen | 27 |
| 2 Zielsetzung..... | 29 |
| 3 Material und Methoden..... | 30 |
| 3.1 Versuchstiere | 30 |
| 3.2 Molekularbiologische Methoden..... | 35 |
| 3.2.1 RNA Isolation..... | 35 |
| 3.2.2 Synthese komplementärer DNA | 38 |
| 3.2.3 Realtime-Detektion-PCR | 40 |
| 3.2.4 Zymographie | 44 |
| 3.3 Histologische und Immunhistologische Färbungen | 45 |
| 3.4 Statistische Auswertung..... | 49 |
| 4 Ergebnisse und Auswertung..... | 50 |
| 4.1 Orale MAP-Exposition in BALB/c-Mäusen | 50 |
| 4.1.1 MAP und die Induktion der Zytokin-Genexpression | 50 |
| 4.1.2 Quantifizierung der MMP Genexpression durch RT-PCR | 51 |
| 4.1.3 Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren durch orale Exposition mit MAP | 54 |
| 4.1.4 Histologische und immunhistologische Ergebnisse..... | 56 |
| 4.2 Intraperitoneale MAP-Infektion in T-Zell-rekonstituierten BL/6-Mäusen..... | 62 |
| 4.2.1 Zytokin-Genexpression nach intraperitonealer MAP-Infektion | 62 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.2 Einfluss einer MAP-Infektion auf die MMP-Genexpression | 64 |
| 4.2.3 Toll-like-Rezeptor-Genexpression bei MAP-Infektion..... | 66 |
| 4.2.4 Immunhistologische Ergebnisse | 67 |
| 5. Diskussion..... | 74 |
| 5.1 Bedeutung der MAP-Infektion für Mensch und Tier..... | 74 |
| 5.2 Problematik des adäquaten Tiermodells für die MAP-Infektion | 75 |
| 5.3 Diskussion zu den angewandten Tiermodellen | 78 |
| 5.3.1 Orale MAP-Exposition in BALB/c Mäusen | 78 |
| 5.3.2 Intraperitoneale MAP-Infektion in T-Zell-rekonstituierten BL/6-Mäusen | 82 |
| 5.4 Limitationen der Tiermodelle | 88 |
| 6. Zusammenfassung..... | 90 |
| 7. Summary..... | 92 |
| 8. Abbildungsverzeichnis..... | 94 |
| 9. Tabellenverzeichnis..... | 95 |
| 10. Abkürzungsverzeichnis..... | 96 |
| 11. Literatur | 98 |
| 12. Ehrenwörtliche Erklärung..... | 119 |
| 13. Danksagung | 120 |

1 Einleitung

Mykobakterielle Infektionen spielen weltweit eine bedeutende Rolle. Nach Einschätzung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist bereits ein Drittel der Weltbevölkerung mit dem Tuberkulose-Erreger infiziert, wobei jedes Jahr rund 2 Millionen Todesfälle infolge von Tuberkulose (TB) verzeichnet werden. Die WHO rechnet bis zum Jahre 2020 weltweit mit einer Milliarde Neuinfektionen, 150 Millionen Neuerkrankungen und in der Folge mit bis zu 36 Millionen Todesfällen (1).

Morbus Crohn (Crohn's disease CD) und Colitis ulcerosa (Ulcerative colitis UC) sind chronisch entzündliche Erkrankungen des Verdauungstraktes. Bei der Erkrankung entstehende Läsionen treten in der Regel im terminalen Ileum und proximalen Kolon auf. Seit der Veröffentlichung von Thomas Kennedy Dalziel im Jahre 1913 wird wegen der klinischen Ähnlichkeiten der Zusammenhang zwischen CD und *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) stark diskutiert (2). Die Abbildung 1 nach Chacon et al. zeigt die mögliche Übertragung von MAP vom Tier zum Menschen (3).

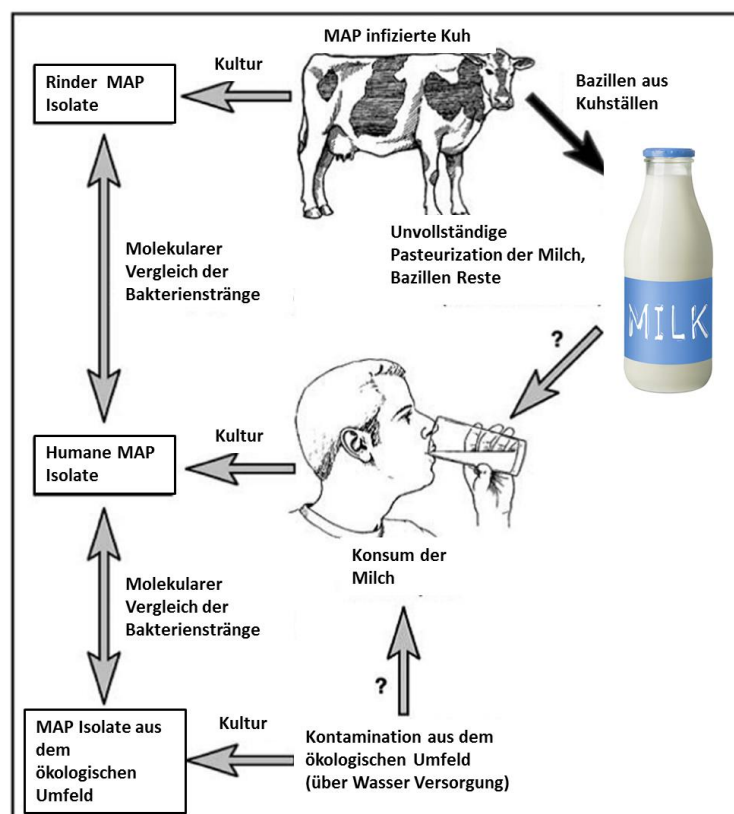


Abbildung 1: Mögliche MAP-Exposition
(modifiziert nach Chacon et al. (3))

Matrix-Metalloproteinasen (MMP) sind zinkbindende Endopeptidasen und gehören zu der Familie der proteolytischen Enzyme. Durch ihr hohes proteolytisches Potential spielen die MMPs eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen, wie z. B. bei der Wundheilung, Mukosadestruktion, der Inflammations-assoziierten Karzinogenese und der mukosalen Barrierefunktion sowie der Metastasierung und bei entzündlichen Darmerkrankungen (inflammatory bowel diseases IBD). In gesundem Gewebe wird dieses proteolytische Potential der MMPs zur Regulierung der Homöostase der extrazellulären Matrix durch körpereigene MMP-Inhibitoren, den Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), streng reguliert. Diese Balance ist wichtig, da eine Störung mit verschiedenen Pathologien, wie z. B. einer Fibrose und bösartigen Tumoren, einhergehen kann.

MMPs spielen vermutlich auch während der Infektion mit pathogenen Mykobakterien, einschließlich MAP, eine Rolle. Seit der Erstbeschreibung von klinischen Ähnlichkeiten zwischen CD und Paratuberkulose bei Rindern im Jahr 1913 wird vermutet, dass MAP einen Erreger für CD darstellen könnte. Seitdem konnte in einer Reihe von Studien häufiger MAP in CD-Patienten nachgewiesen werden als in den Kontrollgruppen. Dennoch ist nach wie vor umstritten, ob MAP einen ätiologischen Faktor für CD oder eher eine sekundäre Infektion in entzündeter Darmschleimhaut darstellt.

1.1. *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*

1.1.1 Gattung *Mycobacterium*

Der Genus *Mycobacterium* gehört als einziger Vertreter zur Gattung der Familie *Mycobacteriaceae* in der Ordnung Actinomyceteten (Actinomycetales). Derzeit sind mehr als 100 Spezies bekannt. Die meisten der über 50 Arten der Gattung *Mycobacterium* sind nicht pathogen. Einige wenige Spezies, wie *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium avium avium* (MAA) sowie *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP), die Erreger der Tuberkulose, Lepra, Geflügeltuberkulose und Paratuberkulose, sind pathogen. Pathogene Mykobakterien sind typische, fakultativ intrazelluläre, eher langsam wachsende Bakterien (4-6).

Der *Mycobacterium avium* Komplex (MAC) umfasst *Mycobacterium avium intrazellulare*, *Mycobacterium avium avium* (MAA), *Mycobacterium avium paratuberculosis*, *Mycobacterium avium hominissuis* und *Mycobacterium avium silvaticum*, welche in der Umwelt relativ weit verbreitete Mykobakterien darstellen (7). *Mycobacterium intrazellulare* und MAA sind Verursacher von Mykobakteriosen bei immunsupprimierten

Menschen (8), wobei MAA einer der wichtigsten opportunistischen Infektionserreger bei HIV-Patienten (9) sowie der Erreger der Geflügeltuberkulose ist (10). Ein weiterer relevanter Krankheitserreger ist MAP als Verursacher der Paratuberkulose bei Wiederkäuern (11).

Allgemein sind Mykobakterien aerobe, unbewegliche, leicht gekrümmte, schlanke Stäbchen. Sie besitzen eine Länge von 3-5 µm und eine Breite von ca. 0,3 µm. Mykobakterien sind grampositive Bakterien mit einer extrem hohen Säurefestigkeit (12,13).

Mykobakterielle Zellwand

Die mykobakterielle Zellwand besteht hauptsächlich aus kovalent an Murein gebundenen Mykolsäuren und Peptidoglykanen. Sie besteht aus mehreren Lipidkomponenten und aus verzweigten Arabinogalaktanketten (Abb.2). Das lipophile Gerüst ist aufgebaut aus Phosphatidylinositolmannosid (PIM), Lipoarabinomannan (LAM) und seinem biosynthetischen Vorläufermolekül Lipomannan (LM). Diese Lipidkomponenten sind über einen nicht-kovalenten Phosphatidyl-Myoinositol-Anker in der Membran an der Mureinbasalstruktur verankert, speziell an den aus Arabinogalactan bestehenden Peptidoglykanen. Die Zellwand der Mykobakterien hat eine wachsartige Oberfläche und bildet die Grundlage für das diagnostische Merkmal der Säurefestigkeit. Dieser Zellwandaufbau macht die Zelle extrem widerstandsfähig und ermöglicht somit das Überleben in nicht aktivierten Makrophagen. Diese Komponenten spielen eine bedeutende Rolle in der Physiologie der Bakterien und bei den Veränderungen während einer Infektion (14-17). Aufgrund der Struktur der mykobakteriellen Zellwand sind die Bakterien undurchlässig für viele Moleküle und somit multiresistent. Nur hydrophile Komponenten können die Zellwand durch Porine überwinden (18).

Die Peptidoglykane der mykobakteriellen Zellwand sind vermutlich für die Modulation der Immunantwort der infizierten Makrophagen von entscheidender Bedeutung (20,21). Untersuchungen konnten LAM als zentralen Liganden bei der Interaktion mit Makrophagen und dendritischen Zellen identifizieren. LAM stellt möglicherweise einen wichtigen Modulator der Immunantwort im Verlauf einer Infektion dar (22). Das heutige Verständnis über den Aufbau der mykobakteriellen Zellwand beruht hauptsächlich auf der Forschung über MTB.

Durch die typische Struktur der mykobakteriellen Zellwand können Mykobakterien mikroskopisch durch die Ziehl-Neelsen-Färbung oder das Acid-fast-Staining dargestellt werden. Die Ziehl-Neelsen-Färbung dient dem Nachweis „säurefester“ Bakterien bzw. Stäbchen. Das Prinzip beruht darauf, dass bei diesen Bakterien wachsartige Mykolsäuren in der Zellwand die Färbung unterbinden, indem sie das Eindringen des

hydrophilen Farbstoffs verhindern. Bei der Ziehl-Neelsen-Färbung wird durch Hitze das Eindringen des Carbofuchsin (Phenolfuchsin) in die Lipidhülle ermöglicht und das Herauslösen des Farbstoffes verhindert (23,24). Hierdurch wird ein mikroskopischer Nachweis von Nestern des Erregers ermöglicht, was vor allem bei Tieren mit klinischer Symptomatik zu beobachten ist, da hier eine ausreichend hohe Sensitivität des Verfahrens durch hohe Bakterienanzahlen zu erwarten ist (25,26).

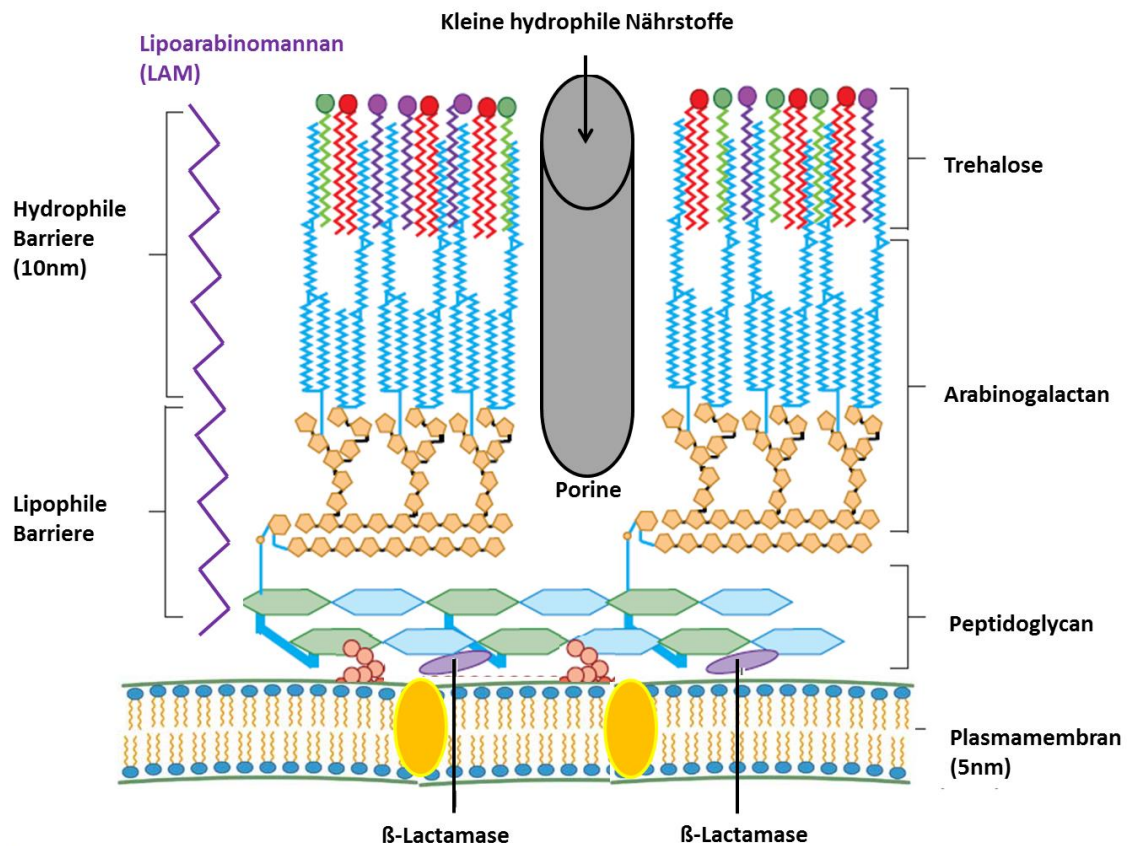


Abbildung 2: Aufbau der mykobakteriellen Zellwand (modifiziert nach Nguyen et al. (19))

1.1.2 Mykobacterium avium subspecies paratuberculosis (MAP)

MAP gehören zum MAC, bestehend aus nicht tuberkulösen Mykobakterien, die ein breites Spektrum von Krankheiten bei Menschen und Tieren verursachen können (27,28). Mitglieder dieser Gruppe sind *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium lepraemurium*, *Mycobacterium avium avium* (MAA), *Mycobacterium avium subsp. hominissuis*, *Mycobacterium avium subsp. silvaticum* und *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) (29).

MAP sind 3 µm lange Bakterien. MAP ist unter den kultivierbaren Spezies mit einer Generationszeit von über 24h unter optimalen Bedingungen die am langsamsten

wachsende Spezies. MAP können in der freien Natur nur in einem Wirt innerhalb von Makrophagen wachsen und können über einen langen Zeitraum in der Umwelt überleben (30,31). Normalerweise bilden MAP 1-2 mm große Kolonien oder rau pigmentierte Kolonien (32). Die genetische Differenzierung von MAP erfolgt über den Nachweis von Insertionselementen (IS). Dabei wird mit Hilfe der PCR-Methode das Insertionselement IS900 bei gleichzeitiger Abwesenheit von IS901 und IS902 detektiert, wobei damit allerdings keine Aussage über die Vermehrungsfähigkeit der Erreger getroffen werden, sondern nur das Vorhandensein von MAP-DNA im untersuchten Probenmaterial nachgewiesen werden kann. Falsch positive Ergebnisse sind somit möglich (33-37). Turenne et al. schlagen eine weitere subspeziesspezifische Differenzierungsmöglichkeit für diagnostische Zwecke über die Sequenzierung des *hsp65* (*heat shock protein*) vor (38).

1.1.3 John's disease - Paratuberkulose

MAP ist hauptsächlich für Wiederkäuer infektiös und scheint der Erreger der Paratuberkulose - einer chronischen granulomatösen Entzündung des Darms bei Wiederkäuern wie Kühen, Primaten und vielen anderen Arten - zu sein, bekannt als Johnesche Krankheit oder Paratuberkulose (11,39). Diese Krankheit wurde 1894 erstmals von dem deutschen Wissenschaftler Johnes und dem Gastdoktoranden Frothingham (Massachusetts) beschrieben (40,41). Die Tiere werden häufig bereits als Jungtiere auf fäkal-oralem Weg, durch kontaminierte Milch oder die Nahrungsaufnahme auf kontaminierten Flächen mit MAP infiziert (41). MAP ist somit in der Lage, chronische Darmentzündungen in vielen Spezies, möglicherweise auch in Primaten, zu induzieren (3,42). Der Darm von infizierten Tieren wird zunächst mit MAP besiedelt. Diese Tiere zeigen über einen Zeitraum von zwei bis fünf Jahren keine klinischen Symptome (30). Die spät auftretenden Symptome dieser Krankheit sind im allgemeinen Durchfall, reduzierte Milchproduktion, Gewichtsverlust und schließlich kommt es zum Tod (6).

Der lange Infektionsverlauf bei infizierten Tieren wird in drei Stadien unterteilt: präklinisches Stadium, präklinische Exkretionsphase und klinische Phase. Die erste präklinische Phase zeichnet sich durch eine ausgeprägte zellvermittelte Immunantwort aus, wobei nicht unbedingt Krankheitssymptome zu beobachten oder Bakterien im Kot nachweisbar sind. Eine humorale Immunantwort besteht zu diesem Zeitpunkt noch nicht. Dem folgt die präklinische Exkretionsphase, bei der die Anzahl der Mykobakterien in der Darmmukosa und im Lumen des Darms stark ansteigt und somit die Erreger auch im Kot nachweisbar werden. Nun ist auch eine ausgeprägte humorale Immunantwort zu

verzeichnen (43). Die dritte klinische Phase ist von unstillbaren wässrigen Durchfällen und einer sich daraus ergebenden Abmagerung gekennzeichnet. Dies hat eine Reduktion der Milchleistung bei Rindern, diffuse Ödeme, Anämie und Infertilität zur Folge. Während der Infektion kommt es innerhalb der Darmmukosa zur intrazellulären Proliferation der Bakterien in infizierten Makrophagen. Dies führt schließlich zum Absterben der Wirtszelle und zur Freisetzung der Mykobakterien. Die freigesetzten Mykobakterien werden wiederum von anderen Makrophagen phagozytiert oder über den Kot ausgeschieden und können ganze Herden infizieren. Die Tiere werden dann in der Regel geschlachtet oder sterben an den Folgen der therapieresistenten Durchfälle (3,11,44-46).

1.1.4 Pathologie und Immunologie

Immunsystem

Die Interaktionen zwischen pathogenen Mikroorganismen und dem Wirt stellen ein komplexes Geschehen dar. Im Allgemeinen kann das Immunsystem zwischen körpereigenen und körperfremden Substanzen unterscheiden. Das Immunsystem hat die Fähigkeit, eingedrungene Mikroorganismen zu erkennen und zu eliminieren. Um sich gegen eine Infektion mit pathogenen Bakterien zu wehren, stehen dem Körper zwei miteinander kommunizierende Immunsysteme zur Verfügung: die angeborene Immunität und die erworbene Immunität (47). Die erworbene Immunität löst eine spezifische Immunantwort über die Bildung von B- und T-Zellen aus, wobei eine Produktion von antigenspezifischen Antikörpern zur Erkennung von körperfremden Peptidantigenen erfolgt. Die angeborene Immunität ist in der Lage, ohne Verzögerung mit seinen Ressourcen direkt auf eine Infektion mit pathogenen Mikroorganismen zu reagieren (48,49). Makrophagen haben ihre wesentliche Funktion in der Phagozytose sowie Antigenpräsentation und werden aufgrund der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle charakterisiert. Verschiedene Rezeptoren vermitteln eine Antigenerkennung und aktivieren z. B. Phagosome, um Pathogene zu degradieren (50).

Aktivierung von Makrophagen

Die heutigen Erkenntnisse dieser gegenseitigen Wechselwirkungen bei MAP basieren hauptsächlich auf der Paratuberkulose-Forschung bei Rindern. Der Erreger MAP gelangt nach Aufnahme über M-Zellen (Mikrofalten-Zellen) des Epithels im Bereich der Peyerschen Plaques in den Darm oder wird über Enterozyten eingeschleust. Die Erreger werden von sub- und intraepithelialen Makrophagen aufgenommen (Abb.3) (48,49,51).

Wenn Mykobakterien den menschlichen Körper infizieren, reagiert das körpereigene System möglicherweise nicht direkt, da Mykobakterien sich versteckt in Makrophagen einnisten. Die wesentliche Funktion der Makrophagen ist es, Fremdkörper bzw. Bakterien aufzunehmen und diese zu zerstören. Die Makrophagen sind zwar in der Lage, Mykobakterien aufzunehmen, können diese aber nicht immer eliminieren (52-55).

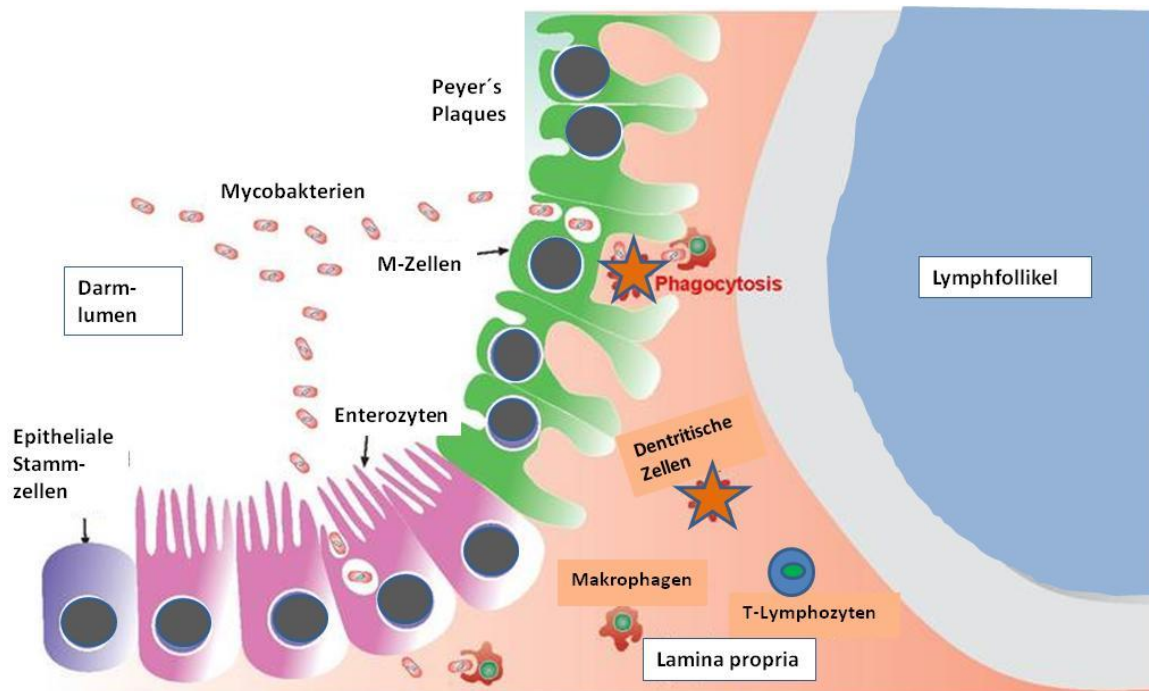


Abbildung 3: Mykobakterielles Eindringen in die Darmwand (modifiziert nach Immunopaedia (56))

Sobald Krankheitserreger die Epithelbarriere überwinden, werden sie von Phagozyten erkannt und es kommt zur Sekretion von inflammatorischen Mediatoren und Zytokinen. Die Antigenpräsentation erfolgt durch *major histocompatibility complex* (MHC), und gleichzeitig werden Oberflächenmoleküle exprimiert, die die Aktivierung und die klonale Proliferation der zum jeweiligen Antigen passenden naiven CD4⁺-T-Lymphozyten bewirken, die wiederum B-Lymphozyten, CD8⁺-T-Lymphozyten und weitere Makrophagen aktivieren (50).

Erkennung grampositiver Mykobakterien durch PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*)

Im folgenden Abschnitt wird der Einfluss von mykobakteriellen Antigenen als Modulatoren auf Makrophagen beschrieben. Bei der angeborenen Immunität ist es wichtig, dass nicht jedes mögliche Antigen als „fremd“ eingestuft wird, sondern nur bestimmte Strukturen erkannt werden. Dies erfolgt dadurch, dass Makrophagen über bakterielle PAMPs aktiviert werden, wozu Lipopolysaccharide (LPS), Flagellin,

Peptidoglykane, Lipoteichonsäuren, Mannane, Glykane, doppelsträngige RNA und bakterielle DNA gehören, die ausschließlich von Mikroorganismen gebildet werden (50,57). Die Zellwand der grampositiven Mykobakterien ist lipidreich und enthält viel Mykolsäure und Mykoside, welche als Virulenzfaktoren eingestuft werden, da sie stark immunmodulatorisch und antiinflammatorisch wirken (58).

PAMPs werden über *Toll-like-receptors* (TLRs) von Makrophagen erkannt, was zur Sekretion biologisch aktiver Mediatoren, wie proinflammatorischer Zytokine, führt. TLRs gehören zu den PRRs („*pattern-recognition receptors*“) und sind Rezeptoren, die bei der unspezifischen Erkennung von Pathogenen und damit bei der Immunität eine zentrale Rolle spielen (vgl. Abschnitt 1.3) (59).

Immunabwehr infizierter Makrophagen

Durch die Erkennung von PAMPs über TLRs und Effektormoleküle bilden sich Cluster von infizierten und nicht infizierten Makrophagen, die miteinander interagieren, um ein Granulom zu bilden. Das klinische Erscheinungsbild mykobakterieller Infektionen ist durch die Granulombildung geprägt. Während der Infektion kommt es innerhalb der Darmmukosa zur kontinuierlichen intrazellulären Proliferation des Erregers im infizierten Makrophagen. Bisher ist wenig über die an der Regulation der Granulombildung beteiligten Zytokine und Chemokine bekannt. Einige Studien konnten die Bedeutung des Zytokins TNF- α für die Bildung der Granulome durch die Regulation der Chemokinsynthese anderer Immunzellen zeigen (48,52-55,60).

Beim Eintritt in die Makrophagen ändern Mykobakterien die Phagosome, so dass eine Fusion zum Phagolysosom verhindert wird und dadurch die Bakterien vor Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus geschützt sind (Abb.4) (61,62). Die Bakterien können somit überleben und proliferieren innerhalb der Phagosomen der Makrophagen. Der Aufbau der Zellwand bietet zusätzlich einen gewissen Schutz vor dem feindlichen Phagosomenmilieu (63).

Da die Erreger-Wirt-Interaktion während einer MAP-Infektion hauptsächlich innerhalb der Makrophagen stattfindet, ist die proinflammatorische und zytotoxische Immunantwort essenziell für die Kontrolle der Infektion. Infizierte Makrophagen könnten als Shuttle für MAP im Wirt fungieren (64,65). Im Dünndarm und Dickdarm und sogar in der Leber können Granulome aus Makrophagen und Lymphozyten bei einer MAP-Infektion auftreten (66).

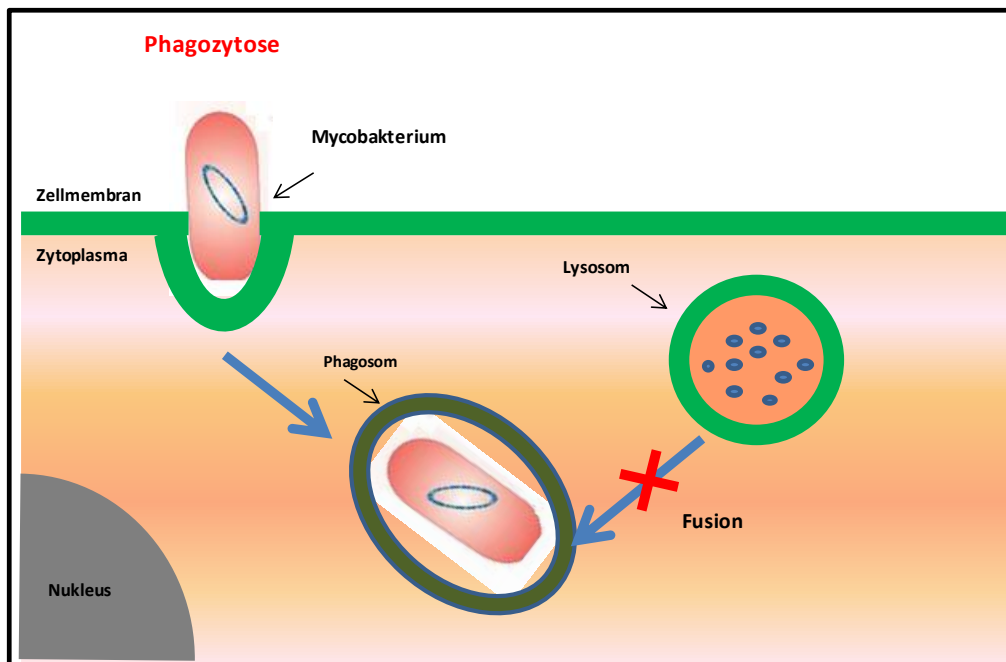


Abbildung 4: Phagozytose bei Mykobakterien
(modifiziert nach Immunopaedia (56))

Zellvermittelte Immunabwehr

Die erste Reaktion des Organismus auf den Erreger ist eine starke zellvermittelte und auf den Darm begrenzte Immunabwehr. Diese wird vor allem durch $CD4^+$ -Zellen, aber auch durch zytotoxische $CD8^+$ -T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen vermittelt. Die Makrophagen, die die MAP erfolgreich abtöten konnten, wandern vermutlich in die Lymphknoten. Dort aktivieren diese über die Antigen-Präsentation T-Lymphozyten und es kommt zu einer Proliferation spezifischer zytotoxischer $CD8^+$ -T-Zellen und $CD4^+$ -T-Helfer-Zellen. Diese proliferieren daraufhin und gelangen über die Blutbahn an den Ort der MAP-Infektion (12,67,68).

In der Regel vergrößern sich granulomatöse Läsionen unter dem Einfluss von $CD4^+$ -T-Zellen durch die Produktion von Interferon gamma ($IFN-\gamma$) und die Rekrutierung von anderen Zelltypen, wie Lymphozyten, Makrophagen und Fibroblasten (46,69-74). Verschiedene T-Zell-Untergruppen konnten in den verschiedenen Stadien der Krankheit im Ileum von Schafen mit natürlicher Paratuberkulose beobachtet werden. Im Ileum von infizierten Schafen lag der Anteil der $CD4^+$ -T-Zellen höher als in normalem Gewebe. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der $CD8^+$ -T-Zellen verringert (75). In natürlich und experimentell infizierten Ochsen, die sich in einem frühen Stadium der Krankheit befanden, waren die $CD8^+$ -T-Zellen erhöht und $CD4^+$ -T-Zell-Aktivität verringert, wobei in einem späteren Stadium der Erkrankung die $CD4^+$ -T-Zellen prävalent waren (68,76).

Aus der Tuberkuloseforschung ist bekannt, dass die Kontrolle der Infektion vor allem von $CD4^+$ -T-Lymphozyten abhängig ist. Untersuchungen haben gezeigt, dass die von ihnen synthetisierten Mediatoren $IFN-\gamma$ und IL-2 die Aktivierung der Makrophagen aus dem

Blutstrom induzieren und somit die Infektion kontrollieren (46,77). Ob dieser Effekt auch bei MAP-infizierten Makrophagen eintritt, ist bislang nicht geklärt. Für die Elimination von MAP müssen die Makrophagen aktiviert werden; diese wiederum benötigen zur Aktivierung das koordinierte Zusammenspiel von IFN- γ , Th1-Zellen sowie von IL-1, IL-6 und TNF- α (64). Diverse Studien untersuchten die Rolle dieser Zytokine in der Pathogenese der Paratuberkulose und konnten Hinweise darauf geben, dass MAP eine verstärkte Expression der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α hervorruft (54,65,78,79). Somit sind eine Reihe unterschiedlicher Zytokine an der Kontrolle mykobakterieller Infektionen beteiligt. Zum besseren Verständnis werden die in dieser Arbeit betrachteten Zytokine kurz näher erläutert.

Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) ist ein potentes proinflammatorisches Zytokin, welches im mukosalen Darmgewebe bei mehreren Autoimmunerkrankungen, einschließlich rheumatoider Arthritis und CD, erhöht ist. Darüber hinaus ist TNF- α gegenüber pathogenen Mykobakterien ein vielseitig wirkender Faktor der Immunantwort. In vitro-Studien haben eine erhöhte Expression von TNF- α in mukosalen Zellkulturen von MAP-positiven CD-Patienten, sowie eine erhöhte T-Zell-Proliferation von peripheren mononukleären Zellen dieser Patienten identifiziert (80,81). Durch MTB Infektionen wird die TNF- α -Sekretion in den Makrophagen induziert, wobei in TNF- α -defizienten Mäusen eine MTB Infektion zum raschen Tod der Tiere führt (82). Des Weiteren ist bekannt, dass die Regulation von TNF- α mit der Bildung von Granulomen in mykobakteriell infizierten Individuen korreliert. Studien haben gezeigt, dass durch die Inaktivierung von TNF das Granulom in Paratuberkulose erkrankten Tieren nicht weiter stabilisiert wird und dies eine Verschlechterung der Erkrankung zur Folge hat (6,79,83).

Interleukin alpha/beta (IL-1 α/β) wiederum ist essentiell für eine klonale Expansion der T-Zellen (79). IL-1 ist in MTB-infizierten Makrophagen für die akute Phase verantwortlich, bei der z. B. Fieber und Kachexie auftreten. Außerdem wird IL-1 eine immunsupprimierende Wirkung während der MTB Infektion zugeschrieben (55,74). In dieser Arbeit wird anhand der vorangehenden Arbeiten das Augenmerk in der IL-1-Gruppe auf IL-1 β gelegt. IL-1 β wird bei proteolytischen Prozessen aktiviert; auch wurde eine erhöhte Produktion von IL-1 β , TNF- α und IL-6 in der Schleimhaut mikroskopisch normaler CD-Patienten beobachtet, wobei IL-6 hier einen wichtigen Faktor für die Inflammation und die T-Zelldifferenzierung darstellt (84,85).

Zusammenfassend ist zu unterstreichen, dass Makrophagen die erste Abwehr gegen eine Infektion mit MAP bilden, aber auch die Hauptzielzellen im Wirt darstellen. Durch noch nicht genau geklärte molekulare Mechanismen gelingt es MAP, die infizierten Makrophagen in einem inaktiven Zustand zu halten. Viele unterschiedliche und manchmal widersprüchliche Ergebnisse über die Immunantwort des Wirtes gegen MAP

wurden veröffentlicht. Tatsache ist, dass bis heute nur wenige Daten zur Verfügung stehen, die zuverlässige Aussagen erlauben. Ein konkreter Zusammenhang zwischen MAP-Infektion und chronischer Darmentzündung beim Menschen mit CD konnte in einigen Studien nachgewiesen werden, während andere Untersuchungen eine solche Beziehung nicht bestätigen konnten (86-92).

1.1.5 Tiermodelle zur Infektion von MAP

Der natürliche Weg der Infektion von MAP bei Wiederkäuern ist fäkal-oral (41). Dennoch wurden im experimentellen Setting viele Versuche mit MAP-Infektion in verschiedenen Tiermodellen und mit verschiedenen Infektionsarten durchgeführt. Entsprechend der aktuellen Literaturarbeiten werden experimentelle Infektionen bei Schafen, Rindern, Hirschen, Ziegen, Pferden, Schweinen, Kaninchen, Ratten, Hamstern, Meerschweinchen, Hühnern und Mäusen durchgeführt. Die Infektion mit MAP wurde dabei subkutan, intratonsillar, intrainestinal, intragastrisch, intrauterin, intratracheal, intraperitoneal (i.p.), intravenös (i.v.) und oral durchgeführt. Unterschiedliche *Mycobacterium avium*-Stämme wurden für unterschiedliche Tiermodelle genutzt. Relativ oft wurde der vom Rind isolierte K10-Stamm verwendet (93,94). Des Weiteren unterschieden sich die Infektionsdosis und die Anzahl der Applikationen. Die Beobachtungszeit der Experimente reichte bis zu mehreren Jahren, aber auch kürzere Zeitpunkte wurden als Endpunkte eingesetzt. Besonders bei Mäusen wurde eine unterschiedliche Anfälligkeit von verschiedenen Stämmen bei der Infektion mit MAP beobachtet.

In einer für die vorliegende Dissertation richtungsweisenden Arbeit wurde ein Vergleich der i.p. Infektion in Mäusen mit 1×10^9 CFU (*colony forming unit*; Lebenszellzahl von Mikroorganismen) des MAP-Stammes ATCC 19698 in C57Bl/6 (Inzucht-Mausstamm abgeleitet vom C57BL-Stamm) und C3H/HeN-Mäusen (von C3H-Elternstamm stammende Labormaus-Inzuchtlinie) durchgeführt. Es wird hier bereits darauf hingewiesen, dass C57Bl/6-Mäuse anfälliger für MAP sind als C3H/HeN-Mäuse. Es liegt die Vermutung nahe, dass unterschiedliche T-Zell-Untergruppen eine Rolle bei der ungleichen Anfälligkeit dieser beiden Maus-Stämme spielen könnten (95). Um den adaptiven Transfer von MAP bei nude/SCID-Mäusen (*SCID* = *severe combined immunodeficiency*; schwerer kombinierter Immundefekt) zu testen, wurden Milzzellen von nicht-infizierten BALB/c (im Labor gezüchtete Albino-Maus) Mäusen 2 Wochen nach Infektion mit 1×10^6 CFU eines MAP-Rinder-Isolats i.p. inokuliert. Der Infektionsverlauf wurde bis 12 Wochen nach der Infektion beobachtet. Die Autoren beschreiben, dass der adaptive Transfer auf nude/SCID-Mäuse zu einer erhöhten Resistenz gegen MAP führt.

Obwohl dieses adaptive Transfer-Modell geeignet zu sein scheint, um die MAP-Infektion zu induzieren, wurde auch gezeigt, dass dieser Transfer allein bereits zu einer erhöhten Entzündung des Darms führen kann (96,97). Des Weiteren wurde der Wirkung von CD4⁺ CD45RB^{high} T-Zellen (naive T-Zellen) eine Bedeutung zugeschrieben. Diese T-Zell-Population konnte bei Übertragung in immundefiziente Mäuse eine Colitis verursachen. Dieser Effekt wurde durch die gleichzeitige Übertragung von CD4⁺ CD45RB^{low} T-Zellen (aktivierte Gedächtnis-T-Zellen) gehemmt (98).

CD45RB ist ein Mitglied der Protein-Tyrosin-Phosphatase-Familie, wird von Leukozyten exprimiert und ist bekannt als wesentlicher Regulator der T-Lymphozyten (99). Der adaptive Transfer von CD4⁺CD45RB^{hi} T-Zellen (naive T-Zellen) von gesunden Wildtyp-Mäusen in immunkomprimierte (lymphopenic) Mäuse führte 5 bis 8 Wochen nach der T-Zell-Rekonstitution zur Colitis und Dünndarmentzündung. Dieses Modell ist für die Untersuchung der Beteiligung von spezifischen T-Zellen an der Fehlregulation der T-Lymphozyten von Bedeutung (96). Eine Co-Injektion von CD4⁺CD45RB^{lo} T-Zellen (aktivierte Gedächtnis-T-Zellen) konnte die Entwicklung einer Colitis unterdrücken (100). Unterschiede in den Tiermodellen, MAP-Stämmen, Inokulationsdosen und Zeitplänen haben die Untersuchungsergebnisse beeinflusst. Keines der beschriebenen Modelle konnte bisher als Gold-Standard-Modell für eine natürliche MAP-Infektion und Pathologie betrachtet werden (93,94,98).

Speziell für unsere Untersuchungen zur i.p. Infektion mit MAP wählten wir immungeschwächte Mäuse. Diesen sogenannten Rag2^{-/-}-Mäusen fehlen die „Rekombination aktivierenden Gene“ (Rag2^{-/-}), die notwendig für die Umlagerung der Gensegmente sind, welche die T- und B-Zell-Rezeptoren bilden. Als Folge fehlen derartigen Mäusen die Zellen des adaptiven Immunsystems, und sie sind stark immungeschwächt (101). In der vorliegenden Arbeit zur Rekonstitution verschiedener T-Zell-Subpopulationen wurde für die MAP-Infektion die i.p. Injektion gewählt, da derzeit noch kein in vivo Maus-Modell mit einer mukosalen Translokation beschrieben wurde. Infizierte Mäuse wurden hierfür mit verschiedenen T-Zell-Subpopulationen rekonstituiert; anschließend wurde das Darmgewebe auf Anzeichen von Immunaktivierung untersucht, wie die Bildung von Granulomen oder die Hochregulation der MMPs, TIMPs, Toll-like-Rezeptoren und proinflammatorischen Zytokine.

1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

1.2.1 Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind durch wiederkehrende und teils anhaltende kontinuierliche Krankheitsschübe gekennzeichnet. Zu den häufigsten CED gehören Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, die unspezifische chronische entzündliche Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes darstellen. Beide Erkrankungen weisen ähnliche Symptome auf: Bauchschmerzen, häufige z. T. blutige Durchfälle sowie bei länger anhaltenden Schüben Gewichtsverlust und Schwäche. CD und UC gehören zur Gruppe der Inflammatory Bowel Diseases (IBD) und werden als inflammatorische Veränderungen des Gastrointestinaltraktes zusammengefasst (102).

Morbus Crohn ist eine chronische transmurale Entzündung, die durch eine Wechselwirkung zwischen Darminhalt und Immunsystem entsteht (102). Histologisch entstehen bei CD Läsionen, bei der es zu einer Infiltration von Entzündungszellen im Darm kommt, was zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und somit zu einer verstärkten Immunantwort führt (103). Charakteristisch treten Epithelzellgranulome und mehrkernige Riesenzellen, sowie Hyperplasien der Lymphknoten und Fisteln auf (Abb.5). Makroskopisch ist eine Verdickung der Darmwand, Einengung des Lumens sowie Stenosebildung zu beobachten. Darüber hinaus ist eine knotige „pflastersteinartige“ Mukosa zu erkennen, welche durch ulzerierte Mukosa und verdickte Submukosa entsteht. Die Ulzerationen können sich auf die Submukosa und die Muscularis ausdehnen, die dann als Fisteln und Fissuren zu sehen sind. CD kann im gesamten Verdauungstrakt auftreten, wobei eine vermehrte Lokalisation im terminalen Ileum und Kolon verzeichnet wird. Prinzipiell kann jeder Abschnitt des Magen-Darm-Trakts betroffen sein, wie auch bei der Paratuberkulose beim Rind beschrieben (3). Die Symptome der CD sind allgemeines Unwohlsein, chronischer Gewichtsverlust, Bauchschmerzen und Durchfall (103,104).

Colitis ulcerosa ist eine Erkrankung, die auf die Darmschleimhaut des Kolon (Mukosa und Submucosa) begrenzt ist. Es kommt zu einer Infiltration mit Lymphozyten und Plasmazellen, die wiederum zu Kryptenabszessen und Kryptenatrophie führt. Bei langjährigen Verläufen und wiederholten Entzündungsprozessen kann es zu einer submukösen Fibrose kommen (105). Makroskopisch ist der Verlust der Haustrierung zu beobachten, wodurch eine glatte „fahrradschlauchartige“ Struktur der Kolonwand entsteht. In den meisten Krankheitsfällen beginnt die UC distal im Rektum und breitet sich kontinuierlich nach proximal zum Kolon aus. Oft beginnt die Krankheit schleichend,

und die Patienten haben bei Diagnosestellung bereits über Jahre Symptome. Auch hier ist die genaue Ätiologie bis heute unklar. Bei schweren Verläufen der Krankheit sind mehr als 20 Stühle pro Tag möglich, oft verbunden mit krampfartigen Abdominalschmerzen, Gewichtsabnahme, rektalen Blutungen ohne Stuhl, schleimigen Durchfällen sowie mit Inkontinenzproblemen (103,105,106,106). Die Untersuchung mittels Endoskopie stellt bei der UC das beste diagnostische Mittel dar. Endoskopisch findet man für die Erkrankung typische Schleimhautveränderungen mit verminderter Gefäßzeichnung und Ulzerationen (Abb.5).

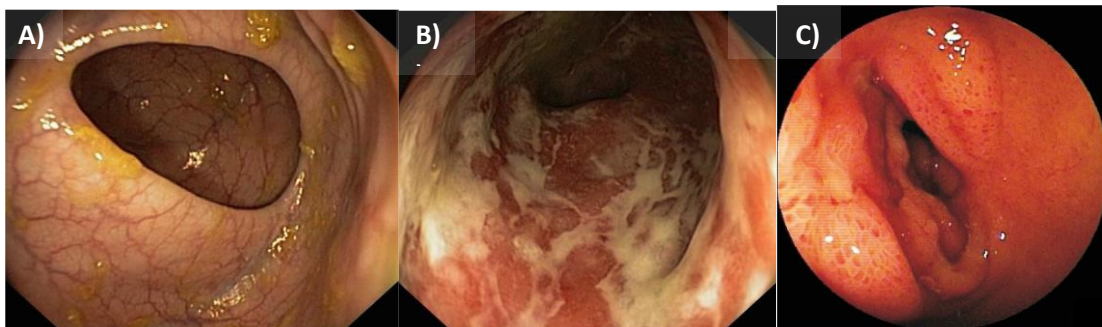


Abbildung 5: Entzündliche Darmerkrankungen

A) Normale Darmschleimhaut. B) Colitis ulcerosa (Endoskopie): starke Entzündung der ödematös veränderten Kolonmukosa mit Verlust der Haustrierung. genehmigt von (107) C) Endoskopisches Bild von Morbus Crohn im Dünndarm (108)

Ätiologie und Pathogenese

Die genaue Grundlage der Pathogenese der CED-Erkrankungen ist noch unklar. Es werden verschiedene auslösende Faktoren diskutiert. Ätiologisch wird bei UC und CD eine multifaktorielle Pathogenese mit Beteiligung von genetischen, mikrobiologischen und immunologischen Faktoren angenommen (81,103,105,109,110).

Die Bedeutung der genetischen Disposition wurde durch Zwillings-Studien bestätigt. In mehreren Untersuchungen konnte demonstriert werden, dass die Wahrscheinlichkeit an CD und UC zu erkranken bei homozygoten Zwillingen deutlich höher (ca. 50%) ist als bei heterozygoten Zwillingen (ca. 5%) (111). Aus diesem Grund wird von einigen Autoren die Existenz von gemeinsamen Genen (z.B. NOD2/CARD15 siehe nächstes Kapitel) angenommen, die im Falle von Mutationen zur phänotypischen Ausprägung bei UC oder CD führen (112).

Es wird vermutet, dass eine unkontrollierte und zu starke Immunantwort des Darmepithels auf das bakterielle Darmmilieu für die Entstehung der chronischen Entzündungsveränderungen der Darmschleimhaut eine wichtige Rolle spielt (113). Bei dieser Reaktion des Immunsystems auf mikrobielle Antigene sind Toll-like-Rezeptoren

wesentlich (TLR; Abschnitt 1.4). TLR sind für die Aufrechterhaltung der intestinalen Epithelzellbarriere verantwortlich (59,114).

1.2.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen und MAP

Bislang gibt es keine überzeugende Erklärung für die Pathogenese der CD. Sowohl verschiedene Umweltfaktoren als auch pathogene oder nicht pathogene Mikroben, Lebensstil, Hygienefaktoren, Ernährung und Stress werden als Gründe für die Entstehung von CD diskutiert (115-120). Es ist bekannt, dass MAP der Erreger der Paratuberkulose bei Tieren ist, und es wird kontrovers diskutiert, ob auch ein Zusammenhang zwischen MAP und der CD-Erkrankung des Menschen bestehen könnte (3,121). Daher wird die Rolle von MAP als Zoonose Erreger in den letzten Jahren verstärkt untersucht.

CD verläuft in Schüben und der gesamte Gastrointestinaltrakt kann betroffen sein. Die Erkrankung beruht auf einer übermäßigen mukosalen Immunantwort bei genetisch prädisponierten Personen gegenüber mikrobiellen Antigenen von Darmmikroben (122,123). Seit 1913 wird – erstmals durch Dalziel – die Beschreibung der klinischen Ähnlichkeiten zwischen CD und Paratuberkulose (John's disease) des Rindes diskutiert (124,125). Chiodini konnte 1984 MAP-ähnliche Organismen bei 2 von 11 CD-Patienten, jedoch bei keinem der weiteren 6 untersuchten Patienten mit anderen IBD nachweisen. Bis 1989 gab es vereinzelt Nachweise von MAP bei CD-Patienten, jedoch konnten diese Studien wegen ihres unterschiedlichen Studiendesigns nicht miteinander verglichen werden (126). François et al. konnten homologe Gensequenzen von 4 MAP-Isolaten aus Probenmaterial von CD-Patienten und 8 von 11 MAP-Isolaten aus Probenmaterial von Tieren feststellen (127). Daraufhin wurde die Hypothese aufgestellt, dass MAP einen Erreger in CD darstellen könnte. Seitdem haben eine Reihe von Studien einen häufigeren Nachweis von MAP-DNA bei Patienten mit CD als in der Kontrollgruppe ohne CD beobachten können (86,128-130).

Rosenfeld und Bressler haben die Gründe für und gegen einen kausalen Zusammenhang zwischen MAP und CD zusammengestellt. Ihnen zufolge spricht für einen Kausalzusammenhang die Tatsache, dass es makroskopische und mikroskopische Ähnlichkeiten zwischen CD und Paratuberkulose bei Rindern gibt. Es konnte auch MAP in Milch und im Wasser nachgewiesen werden, denn MAP-Bakterien können konventionelle Pasteurisierungsverfahren überleben (131). Des Weiteren konnte MAP in Gewebe und Blut von Patienten mit CD häufiger nachgewiesen werden als bei Personen ohne CD. Auch genetische Faktoren, wie die Genmutationen NOD2/CARD15, sind nachgewiesen prädispositionierend für CD. Durch diese Mutationen kommt es zu

einer defekten Immunantwort auf bakterielle Infektionen und dann möglicherweise zu einer ineffektiven Bekämpfung intrazellulärer MAP. Gegen einen kausalen Zusammenhang hingegen spricht nach Rosenfeld und Bressler, dass Menschen mit Kontakt zu MAP-infizierten Tieren keine erhöhte Prävalenz für eine MAP-Infektion besitzen. Ebenfalls konnte in einigen Studien MAP gelegentlich auch bei Personen ohne CD nachgewiesen werden. Außerdem gebe es bislang noch keine Beweise dafür, dass MAP-haltige Nahrung CD hervorruft (131). In der Studie von Saleh et al. wurden Blutproben von 28 CD-Patienten untersucht, wobei bei 16 dieser Patienten ein PCR- und/oder kulturell positiver Nachweis von MAP gelungen ist (132). Weitere Untersuchungen richteten sich auf die Antikörpertiter gegen MAP von Tierärzten und Landwirten, die mit den Titern durchschnittlicher Blutspender verglichen wurden. Es konnte ein wesentlich höherer Titer bei den Tierärzten und Landwirten festgestellt werden. Im Rahmen dieser Studie wurden 11–12 % der Tierärzte und Landwirte, jedoch lediglich 3,3 % der Blutspender als serologisch positiv getestet (133). Bislang wiesen in vitro Studien einen erhöhten TNF- α -Spiegel in mukosalen Kulturen von MAP-positiven CD-Patienten auf. Eine erhöhte T-Zell-Proliferation nach einer MAP-Inkubation von peripheren mononukleären Zellen aus Patienten mit CD wurde als Patho-Mechanismus und zelluläre Antwort beschrieben (80,81).

Dennoch stellt sich nach wie vor die Frage, ob MAP einen ätiologischen / kausalen Faktor für CD oder eher einen sekundären Keim in bereits entzündeter Darmschleimhaut darstellt (86,134,135).

1.3 Toll-like-Rezeptoren

Das Immunsystem erkennt das Eindringen von pathogenen Liganden oder anderen Fremdmaterialien, wobei man zwischen einer angeborenen, nicht-adaptiven und einer erworbenen, adaptiven Immunantwort unterscheidet. Beim angeborenen Immunsystem werden von Rezeptoren konservierte molekulare Strukturen, die als „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) bezeichnet werden, erkannt. Diese erlauben die Unterscheidung zwischen körpereigenen und pathogenen Merkmalen. Zu den pathogenen Merkmalen gehören Zellwandbestandteile und Strukturen von Mikroorganismen wie z. B. Lipopolysaccharide (LPS) von gramnegativen Bakterien, Lipoteichonsäure von grampositiven Bakterien oder auch bakterielle DNA (136,137). Bei der Erkennung dieser pathogenen Bestandteile spielen die Toll-like-Rezeptoren (TLR) eine wichtige Rolle, wobei sie Abwehrzellen aktivieren können, die dann eine Entzündungsreaktion hervorrufen. TLRs sind eine Familie von Proteinen, die die

Fähigkeit haben, mikrobielle Strukturen zu erkennen, und die eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort gegen Infektionserreger spielen (138).

Beim Menschen wurden bisher 11 Mitglieder der TLR-Familie identifiziert. Sie werden von verschiedenen Zellarten des Immunsystems, aber auch von anderen Zellen exprimiert und befinden sich entweder an der Zelloberfläche oder im Zytoplasma (139). TLR-2 und TLR-4 kommt eine Schlüsselrolle in der Erkennung von Bakterien zu. TLR-2 erkennt Lipoproteine und Peptidoglykane von grampositiven Bakterien und TLR-4 die Lipopolysaccharide der gramnegativen Bakterienzellwand. TLR-6 interagiert funktionell mit TLR-2, um eine zelluläre Erkennung von bakteriellen Diacyl-Lipoproteinen zu vermitteln. TLR-5 erkennt das Hauptprotein Flagellin der bakteriellen Geißeln. TLR-3, -7, -8 und -9 werden im Zytoplasma exprimiert und erkennen virale RNA, bzw. bakterielle DNA (139,140).

Über TLRs und durch intrazelluläre Mechanismen wird NF κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) oder JNK (c-JUN N-terminal kinase) gebildet. Die Bindung von spezifischen Liganden an ihren Rezeptoren kann zur Freisetzung von Zytokinen und stimulatorischen Molekülen und zur Veränderung der Expression von Oberflächenmolekülen führen (59).

Die Abbildung 6 veranschaulicht die Toll-like-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion am Beispiel von TLR-9. Die Stimulation des TLR führt über viele Zwischenschritte zur Expression von inflammatorischen Zytokinen, TNF- α , TNF- β sowie verschiedener Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) (141). In einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen wurde die Regulation der MMPs durch TLRs beeinflusst (85). Es gibt erste Hinweise, dass MMPs während der Infektion mit pathogenen Mykobakterien wie z.B. MAP hochreguliert sind, und dass eine mykobakterielle Infektion zu entzündlichen Veränderungen im Gewebe führt (142). In ruhenden Zellen ist TLR-9 auf der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert. Durch Verschmelzen mit der Plasmamembran und anschließender Endozytose gelangt der Rezeptor in lysosomale Zellkompartimente (141).

TLRs spielen somit eine wichtige Rolle bei der Erkennung von verschiedenen Pathogenen, einschließlich MAP (114,143,144). Agonisten von TLR, wie LPS oder LAM, lösen im Makrophagen eine konservierte Signalkaskade aus. Diese Strukturen mit höchst konserviertem Aufbau kommen in einem sehr großen Spektrum von Mikroorganismen vor. Mykobakterien und mykobakterielle Bestandteile aktivieren Makrophagen und dendritische Zellen über TLR; insbesondere TLR-2 in Verbindung mit TLR-1, TLR-6 und TLR-4 wurden als wesentliche Rezeptoren bei der Anerkennung von mykobakteriellen Antigenen identifiziert (145-147). Wie die genaue Signalvermittlung initiiert wird, ist gegenwärtig noch unklar. Im Gegensatz zu anderen Mykobakterien

wurden für die MAP induzierte Signalvermittlung noch kaum Untersuchungen durchgeführt.

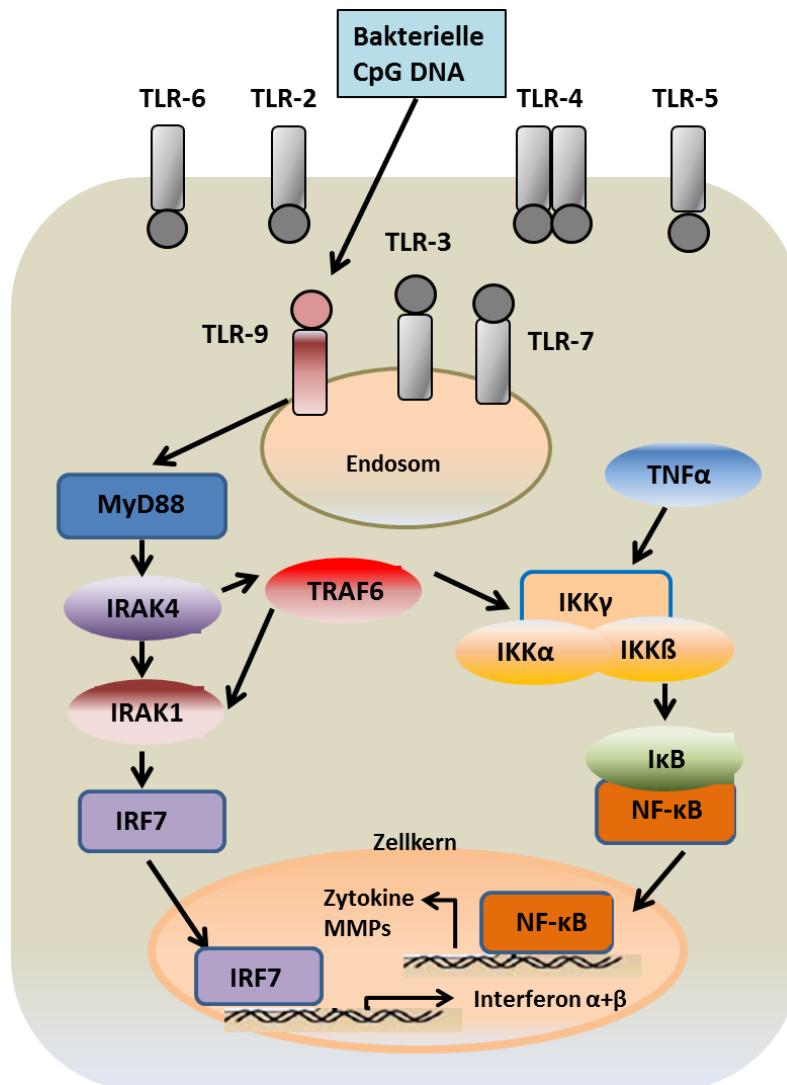


Abbildung 6: NFκB -Signalweg am Beispiel von TLR-9.

(modifiziert nach (140,144,148) Bakterielle CpG-DNA gelangen durch Endozytose in den intrazellulären Raum und werden endosomal von TLR-9 erkannt. Eine Signalkaskade führt zur Aktivierung von MyD88, IRAK, TRAF6 und IκB. Es erfolgt eine Translokation von NFκB in den Nukleus, wodurch die Expression proinflammatorischer Zytokine induziert wird.

1.4 Matrix-Metalloproteinasen

Aufgrund der in dieser Arbeit dargestellten zentralen Bedeutung der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), wird im Folgenden die Rolle von MMPs in der Modulation durch mykobakterielle Infektionen eingegangen.

MMPs gehören zur Familie der zinkabhängigen, endogenen Proteasen mit der Fähigkeit, verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) abzubauen. Die EZM ist der Anteil des Gewebes, der zwischen den Zellen liegt. Sie setzt sich im Wesentlichen aus Kollagenen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen zusammen. Kollagen ist ein extrazelluläres Protein, das dem Gewebe Zugfestigkeit verleiht und fast 90 % der organischen Matrix ausmacht. Der Abbau der EZM-Moleküle wird durch MMPs vermittelt. Alle Körperzellen können MMPs in unterschiedlicher Menge produzieren. Die humanen MMPs sind eine Familie von mindestens 26 zinkabhängigen Endopeptidasen. Entsprechend ihrer unterschiedlichen Substratspezifitäten werden die einzelnen Mitglieder der MMP-Familie in sechs Gruppen eingeteilt (149):

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der MMPs

| | | |
|----|--------------------------------------|--|
| a) | Kollagenasen (Typ I-Kollagenasen) | → MMP-1, MMP-8, MMP-13 |
| b) | Gelatinasen (Typ IV-Kollagenasen) | → MMP-2, MMP-9 |
| c) | Stromelysine | → MMP-3, MMP-10, MMP-11 |
| d) | membranständige MMPs (MT) | → MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25 |
| e) | Matrilysine | → MMP-7, MMP-26 |
| f) | nicht klassifizierbare MMPs | → MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP- 21, MMP-23, MMP-27, MMP-28 |

Funktion

MMPs stellen aufgrund ihres hohen proteolytischen Potenzials die wesentlichen Regulatoren der EZM dar, welche nahezu alle Proteinbestandteile der EZM direkt spalten können und immunologische Funktionen der EZM kontrollieren (150,150,151). Die proteolytische Aktivität der MMPs wird durch spezifische Gewebe-Inhibitoren von Metalloproteinasen (sogenannte Tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs) durch nicht kovalente Bindung der aktiven Form gesteuert (152,153). Durch den Abbau der EZM nehmen die MMPs am "Remodelling" der Organe teil, indem sie die extrazellulären

Moleküle spalten, so dass andere Zellen einwandern können. Besonders wichtig ist dies für die Entwicklung und Regeneration der Gewebe, aber auch für die Migration von inflammatorischen Zellen im Rahmen der Immunreaktion (154-156).

MMPs kommt eine große Bedeutung bei einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen zu. Eine Überexpression von MMPs führt zu einem Ungleichgewicht zwischen der Aktivität der MMPs und TIMPs. MMPs werden wegen ihres Auftretens in den verschiedensten Geweben als Schlüsselenzyme in physiologischen Prozessen wie z. B. bei der Wundheilung, der Mukosadestruktion, der Inflammations-assoziierten Karzinogenese und der mukosalen Barrierefunktion sowie der Metastasierung von Tumoren und der Mukosadestruktion bei entzündlichen Darmerkrankungen gesehen. Die Bedeutung ist in den meisten Prozessen auf eine Umstrukturierung der EZM zurückzuführen. Das regulierte Gleichgewicht von Auf- und Abbau der EZM ist in pathologischen Prozessen gestört, so dass es zu einer gestörten Degradierung der EZM kommt. Im gesunden Gewebe sind die meisten MMPs nur in geringen Mengen nachweisbar (157,158). Viele MMPs werden als inaktive Vorstufen sezerniert. Nach der Sekretion werden MMPs durch ihre spezifischen Inhibitoren, die TIMPs, gehemmt. TIMPs binden an unterschiedlichen Stellen im jeweiligen MMP-Molekül (159). Tabelle 2 stellt eine Übersicht über die verschiedenen MMPs, ihre Substrate und die exprimierenden Zellen dar.

Tabelle 2: Übersicht der humanen Matrix-Metalloproteinasen.

modifiziert nach (160,161)

| MMPs | Herkömmlicher Name | Substrat | Produzierende Zellen |
|---------------|--|--|---|
| MMP-1 | Interstitielle Kollagenase 1 | Kollagene I, II, III, VII, VIII, X, Gelatine, Aggrecan, Myelinbase-Protein, proTNF- α , MMP-2, MMP-9, IL-1 β , L-Selektin, Casein, α 1-Antitrypsin, Ovostatin. | Tumorzellen (Mamma, Kolon, Prostata), Fibroblasten, Entzündungszellen |
| MMP-2 | Gelatinase A | Kollagene I, IV, V, VII, X, XI, XIV, Gelatine, Elastin, Laminin, Fibronectin, Aggrecan, Myelinbase-Protein, B Amyloid, proTNF- α , MMP-9, MMP-13 | Tumorzellen (Mamma, Kolon, Lunge, Prostata, Pankreas, Ovarien), Fibroblasten, Endothel |
| MMP-3 | Stromelysin-1 | Kollagene II, IV, IX, XI, X, Gelatine, Perlecan, Fibronectin, Laminin, Elastin, Ovostatin, Myelinbase-Protein, proTNF-, pro-MMP-1, pro-MMP-7, pro-MMP-8, pro-MMP-9, pro-MMP-13 | Tumorzellen (Mamma, Kolon, Lunge, Pankreas), Fibroblasten, Endothel |
| MMP-7 | Matrilysin 1 PUMP-1 | Kollagene IV, X, Gelatine, Aggrecan, Fibronectin, Laminin, Elastin, Defensin, Proteoglykan, Plasminogen, Myelinbase-Protein, proTNF- α , pro-MMP-1, pro-MMP-2, pro-MMP-9, MMP/TIMP-1-Kpl. | Tumorzellen (Mamma, Kolon, Lunge, Prostata), Fibroblasten, Endothel |
| MMP-8 | Neutrophile Kollagenase 2 | Kollagene I, II, III, V, VII, VIII, X, Gelatine, Aggrecan, Fibronectin, α 2-Antiplasmin | Tumorzellen (Mamma) |
| MMP-9 | Gelatinase B | Kollagene IV, V, VII, X, XIV, Gelatine, Elastin, Aggrecan, Versican, Nidogen, Proteoglykan-Link-Protein, Fibronectin, Myelinbase-Protein, proTNF- α , α 1-Proteinase-Inhibitor | Tumorzellen (Mamma, Kolon, Lunge, Pankreas, Ovar), Endothel, Epithel- & Entzündungszellen |
| MMP-10 | Stromelysin 2 | Kollagene, III, IV, V, Gelatine, Laminin, Aggrecan, Elastin, Fibronectin, pro-MMP-1, pro-MMP-8 | Fibroblasten |
| MMP-11 | Stromelysin 3 | α 1-Proteinase-Inhibitor, α 1-Antitrypsin, Laminin | Tumorzellen (Mamma, Kolon, Lunge), Fibroblasten |
| MMP-12 | Metalloelastase Makrophagenelastase | Kollagen IV, Gelatine, Fibronectin, Elastin, Insulin (β -Kette), Laminin, proTNF- α , Myelinbase-Protein | Epitheliale Hauttumoren |
| MMP-13 | Kollagenase 3 | Kollagene I, II, III, IV, Gelatine, Aggrecan, pro-MMP-9, pro-MMP-13 | Tumorzellen (Mamma) Endothelzellen |
| MMP-14 | Membran-Type 1 -MMP | Kollagene I, II, III, Gelatine, Aggrecan, Fibrin, Fibronectin, Laminin, Nidogen, proTNF- α , pro-MMP-2, pro-MMP-13 | Tumorzellen (Mamma, Lunge, Pankreas, Ovar) |
| MMP-15 | Membran-Type 2 -MMP | Kollagene I, II, III, Gelatine, Aggrecan, Fibronectin, Laminin, Nidogen, pro-MMP-2, pro-MMP-13 | |
| MMP-16 | Membran-Type 3 -MMP | Kollagene I, III, Gelatine, Aggrecan, Kasein, Fibronectin, Laminin, pro-MMP-2, pro-MMP-13 | |
| MMP-17 | Membran-Type 4 -MMP | Gelatin, Fibrin, Fibronectin | |
| MMP-19 | RASI-1 | Kollagene I, IV, Gelatin, Aggrecan, Kasein, Fibronectin, Laminin, Nidogen | Plazenta, Lunge |
| MMP-20 | Enamelysin | Aggrecan, Amelogenin | Odontogene Tumoren |
| MMP-21 | | α 1-Antitrypsin | |
| MMP-23 | CA-MMP | Gelatine | Ovarien, Testis, Prostata |
| MMP-24 | Membran-Type 5 -MMP | Gelatine, Fibronectin, Dermatin-Sulfat, pro-MMP-2, pro-MMP-13 | |
| MMP-25 | Leukolysin Membran-Type 6 -MMP | Kollagen IV, Gelatine, Fibrin, Fibronectin, pro-MMP-2 | Tumorzellen (Kolon, Astrozy-, Glioblastome) |
| MMP-26 | Matrilysin 2 Endometase | Kollagen IV, Gelatine, Kasein, Fibrogen, Fibronectin, β 1-Proteinase-Inhibitor | Uterus, Plazenta |
| MMP-28 | Epilysin | Kasein | Lunge, Gehirn, Darm, Muskel, Niere, Tumorgewebe |

Domänenstruktur der Matrix-Metalloproteinasen

MMPs bestehen aus mehreren Domänen, dem Signalpeptid, dem aminoterminalen Propeptid und der katalytischen Domäne mit der hochkonservierten zink-bindenden Region. Je nach Substratspezifität und Vorkommen von Hämapexin-ähnlicher und Fibronectin-ähnlicher Transmembran-Domäne lassen sich die einzelnen Proteasen den Kollagenase-, Gelatinase-, Stromelysin- und membranständigen Subfamilien zuordnen (Abb.7). Alle MMPs werden als Prä-Proenzyme intrazellulär synthetisiert und anschließend als inaktive Proenzyme in den extrazellulären Raum sezerniert. Für den Aufbau und die Funktion der MMPs ist das Zusammenspiel der einzelnen Domänen von großer Bedeutung (162).

Das **Signalpeptid**, bestehend aus 17-20 hydrophoben Aminosäuren, dient der Sekretion der MMPs in das endoplasmatische Retikulum, um anschließend in den extrazellulären Raum sezerniert zu werden. Das Signalpeptid fehlt bei MMP-17, MMP-21 und -22 und MMP-23 (151,163). An das Signalpeptid bindet ein **Propeptid**, welches aus ca. 80 Aminosäuren mit einem hydrophoben Rest am N-terminalen Ende besteht. Am C-terminalen Ende bindet ein Cysteinrest an das Zink-Ion der katalytischen Domäne. Dieses kann das aktive Zentrum blockieren, wodurch dann die MMPs in ihrer inaktiven Form vorliegen. Die Aktivierung des MMPs findet durch die proteolytische Abspaltung des Propeptids statt (151,164,165). Auf das Propeptid folgt die **katalytische Domäne**, welche aus ca. 170 Aminosäuren besteht und die für die katalytische Aktivität essentielle Metallionen, Calcium-Ionen und katalytische Zink-Atome enthält. Durch Histidinreste und einen Cysteinrest kommt die Bindung des katalytischen Zink-Atoms am C-terminalen Ende zustande (150,151). Die **Hinge-Region** setzt sich je nach MMP aus 2 bis 75 Aminosäureresten zusammen und ist wichtig für die Substratspezifität. Die Hinge Region kann Substrate entweder selbst binden oder die Bindung an eine andere Domäne unterstützen. MMP-7 und MMP-26 besitzen keine Hinge Region, da diesen Proteasen die Hämapexin-ähnliche Domäne fehlt (151,166).

Bei fast allen MMPs schließt sich an das C-terminale Ende der katalytischen Domäne eine **Hämapexin-ähnliche Domäne** an. Die Hämapexin-ähnliche Domäne besteht aus etwa 200 Aminosäuren und 4 gleich aufgebauten Abschnitten. Die Hämapexin-ähnliche Domäne spielt eine funktionelle Rolle bei der Substratbindung sowie der Interaktion mit spezifischen Inhibitoren. Des Weiteren vermittelt diese Domäne die Bindung der TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) an das aktive Zentrum und ist daher an der Regulation der MMPs beteiligt (168,169). Zwischen den MMPs gibt es noch Unterschiede in Bezug auf die **Fibronectin-ähnliche Domäne** und die **Transmembran-Domäne**. Die Gelatinasen A und B (MMP-2 und MMP-9) tragen im

Gegensatz zu anderen MMPs innerhalb ihrer katalytischen Domäne die dreifache Wiederholung einer 58 Aminosäure starken Fibronectin-ähnlichen Sequenz. Dieser Sequenzabschnitt ist für die Substratspezifität der Gelatinasen verantwortlich (170).

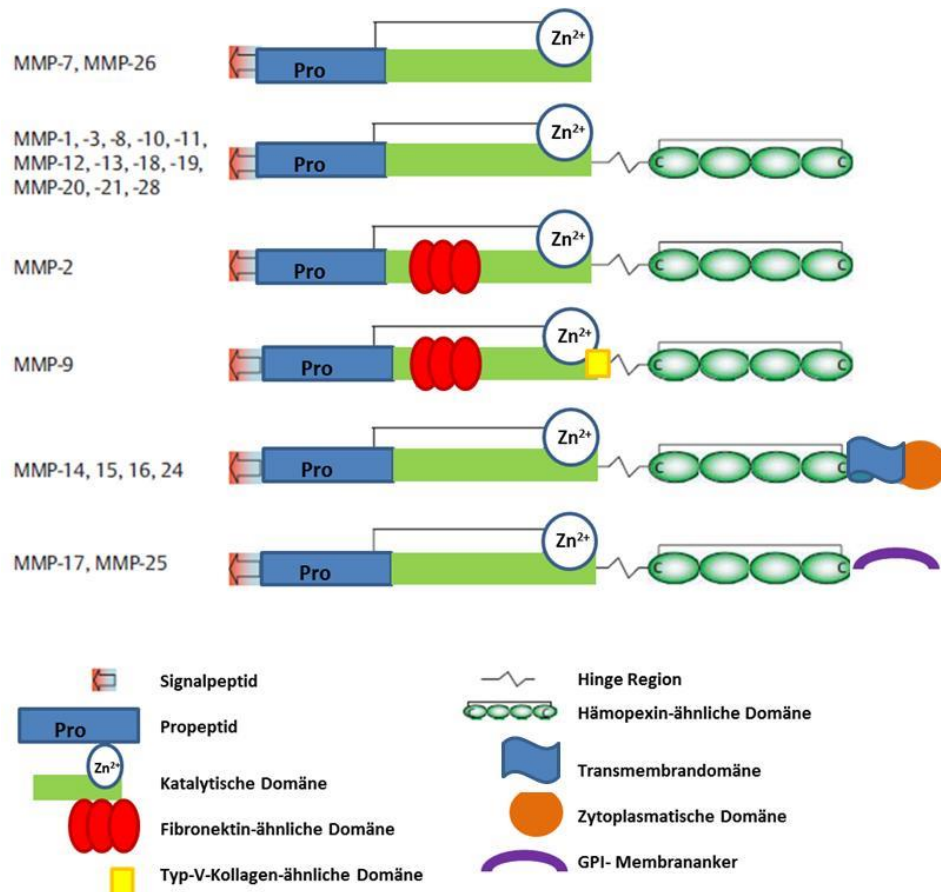


Abbildung 7: Domänenstruktur der Matrix-Metalloproteinasen.
(modifiziert nach Hemmann et al. (167))

1.4.1 Regulation der Matrix-Metalloproteinasen

Praktisch alle MMPs werden als Proenzyme in den extrazellulären Raum sezerniert und anschließend aktiviert. Durch die Fähigkeit der MMPs, nahezu alle Komponenten der EZM abbauen zu können, ist es nötig, dass ihre Regulation sehr strikt verläuft. Die Konzentration und Aktivität der MMPs können durch verschiedene Mechanismen wie Transkription, posttranslationale Aktivierung und Inaktivierung über TIMPs beeinflusst bzw. reguliert werden. Die Kontrolle der MMP-Expression nach der Sekretion in die EZM erfolgt über Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine sowie TIMPs.

Bei der Transkription wirken die Transkriptionsfaktoren und die Promotor-Region zusammen. Die Regulation der Transkription von MMPs erfolgt durch Zytokine,

Wachstumsfaktoren und Hormone, die auf Genebene agieren. Jedoch reagieren nicht alle MMPs gleich auf denselben Anreiz, wobei die Regulation abhängig von der jeweiligen MMP und vom Zelltyp ist (150,171).

Die Faktoren, die die Aktivierung der MMPs beeinflussen, sind vor allem Zytokine, wie TNF- α und Interleukine, inflammatorische Zellen, Wachstumsfaktoren, oxidativer Stress, Hormone und andere (154,172). Die Aktivierung der MMPs aus inaktiven Vorstufen erfolgt proteolytisch oder nicht-proteolytisch. Die proteolytische Aktivierung ist durch extrazelluläre nicht-MMP-Proteine, extrazelluläre andere MMPs oder intrazelluläre Aktivierung des Furin möglich. Proteolytisch wirken Gewebe- oder Plasmaendopeptidasen auf MMPs. Weiterhin sind auch Thermolysin, Chymotrypsin und Trypsin in der Lage, MMPs proteolytisch zu aktivieren (165,173-175). MMPs können sich auch selbst aktivieren. MT-MMPs wie MMP-14 können Pro-MMP-2, Pro-MMP-9 und Pro-MMP-13 sowie MMP-7 und Pro-MMP-3 aktivieren (154,165,172).

Die Inaktivierung der MMPs erfolgt durch körpereigene spezifische „*tissue inhibitors of metalloproteinases*“ (TIMPs), die zur Familie der Kollagenase-Inhibitoren gezählt werden. Die Abbildung 8 veranschaulicht die Aktivierung und Wirkung von MMPs.

Es existieren 4 Typen von gewebespezifischen TIMPs (TIMP-1, -2, -3, -4), die von vielen Zellen, wie Muskelzellen und Makrophagen, abgegeben werden können und die über direkte Korrelation die Aktivität der MMPs kontrollieren. TIMP-1, TIMP-2 sowie TIMP-4 bilden dabei lösliche Proteine, TIMP-3 dagegen ist mit der EZM assoziiert. Die TIMPs bestehen aus zwei Domänen, die durch Disulfidbrücken ihre Stabilität erhalten (153). Diese Domänen binden an die Zinkregion sowie die Hämoexindomäne der MMPs. Für das *tissue remodeling* der EZM ist das Zusammenspiel von MMPs und TIMPs entscheidend (153,171). Ein Ungleichgewicht in der MMP-TIMP-Homöostase führt zu einer verstärkten Degradierung der EZM. Andererseits kann ein hoher Spiegel an TIMPs zu einer Anhäufung der EZM führen. Während TIMP-1 und TIMP-3 eine hohe Affinität für MMP-9 haben, bindet TIMP-2 hauptsächlich an MMP-2 (153,157). TIMP-1 wird u.a. von Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, Chondrozyten, Hepatozyten und hepatischen Sternzellen synthetisiert (176).

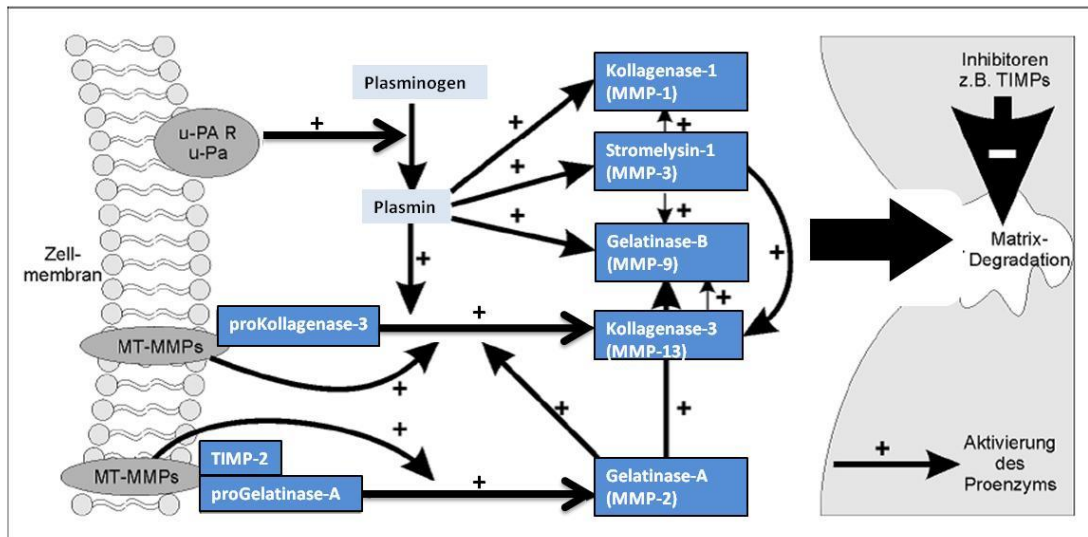


Abbildung 8: Aktivierung und Wirkung von Matrix-Metalloproteinasen.

(modifiziert nach (177)). MMPs werden durch das Plasminogen/Plasmin-System oder durch die Zelloberflächen-gebundene MT1-MMP aktiviert. Zudem aktivieren sich einzelne MMPs gegenseitig. Resultat der gesteigerten MMP-Aktivität ist die Degradation der EZM. Eine Inhibierung der MMP-Aktivität erfolgt durch die natürlichen Inhibitoren der MMPs, die TIMPs.

1.4.2 Matrix-Metalloproteinasen und entzündliche Darmerkrankungen

Die Beteiligung von MMPs an der Entstehung von entzündlichen Darmerkrankungen ist erst in den letzten Jahren intensiver untersucht worden. Die genaue Pathogenese der entzündlichen Darmerkrankungen ist bis heute noch nicht hinreichend geklärt. Bei chronisch entzündlichen Veränderungen der Darmschleimhaut werden Entzündungszellen in das Darmepithel eingeschleust. Die epitheliale Zellproliferation ist verändert und die verschiedenen Bestandteile der EZM werden vermehrt abgebaut, wobei MMPs eine wichtige Rolle spielen. Die Degradation von Kollagenen und Proteinen in der EZM ist der Ausgangspunkt für die Leukozyten- und Makrophagenmigration, die Angiogenese und die Wundheilung (178).

Mehrere Studien konnten eine erhöhte Expression verschiedener MMPs in entzündeter Darmschleimhaut im Vergleich zur normalen Darmschleimhaut nachweisen (179). Von Lampe et al. zeigten, dass die Expression von MMP-1, MMP-2 und MMP-3 mit dem histologischen Grad der Entzündung korreliert und somit die Höhe der MMP-Expression direkt mit der Entzündungsaktivität zusammenhängt (180). Eine erhöhte Expression der MMPs kann möglicherweise zu einer chronischen Entzündung in der Darmschleimhaut führen. Bei CED und in verschiedenen Tiermodellen der Colitis konnte eine vermehrte Expression von MMPs wie MMP-1, -2, -3, -8, -9, -12, -14, gezeigt werden (179-183).

Analysen von Kirkegaard et al. über die Expression und Lokalisation von MMPs bei CD haben belegt, dass MMP-9 von Granulozyten exprimiert wird; auch konnte die Arbeitsgruppe MMP-9 in Gewebe mit akuten Entzündungszuständen nachweisen. Das Gewebe ohne Entzündungszeichen wies keine vermehrte MMP-9 Expression auf (184).

Nach Baugh et al. ist die Aktivität von MMP-1, -2, -3 und -9 in entzündlicher Mukosa von Patienten mit UC gegenüber gesunder Mukosa deutlich gesteigert. In immunhistochemischen Untersuchungen wurde MMP-9 als die am stärksten erhöhte Proteinase in CED identifiziert, die ihren zellulären Ursprung in neutrophilen Granulozyten hat (182).

In verschiedenen CED-Tiermodellen wie der DSS-(dextran sodium sulfate), der TNBS-(Trinitrobenzolsulfonat-) oder der T-Zell-Transfer-induzierten Colitis konnte eine konstante Expressionssteigerung von MMP-3 und MMP-9 beobachtet werden (179,185). Der medikamentöse Einsatz der MMP-Inhibitoren bewirkte im murinen CED-Tiermodell einen abgeschwächten Verlauf der Erkrankung und zeigte allgemein eine Verminderung der Entzündungsaktivität (186,187). Diese MMP-Inhibitoren haben vermutlich auch eine onkologische Bedeutung, da sie in tierexperimentellen Untersuchungen die Tumorprogression beeinflussen konnten (188-190). MMP-Inhibitoren weisen somit prinzipiell ein großes prognostisches und therapeutisches Potential bei der Krebstherapie auf. Untersuchungen zur Expression, Aktivierung und Regulation von MMPs und ihren Inhibitoren könnten daher neue therapeutische Wege eröffnen. Es sind bereits natürliche sowie synthetische MMP-Inhibitoren isoliert und entwickelt worden (191-193). Zu den synthetischen MMP-Inhibitoren, die die MMPs inaktivieren und somit die ECM Degradierung verhindern können, gehören beispielsweise: Marimastat, das die klinische Phase III erreicht hat (191-193) und Batimastat, ein Breitspektrum-MMP-Inhibitor, der in der Therapie maligner Pleuraergüsse zu einer deutlichen Besserung der Dyspnoe geführt hat (194). Ein anderer Mechanismus, bei dem MMPs wirken, ist die Hemmung des Tumorwachstums durch Induktion einer Apoptose in malignen Zellen (195,196).

Eine Reihe von MMPs sind auch in gesundem Darm vorhanden, da sie im Rahmen von physiologischen Abwehrmechanismen in der Darmschleimhaut erhöht exprimiert werden, wie beispielsweise MMP-2 und MMP-7. Die Kollagenasen MMP-1, MMP-8 und MMP-13 sind in der gesunden Darmschleimhaut fast nicht nachweisbar, aber bei CED deutlich hochreguliert (197).

Es gibt Hinweise darauf, dass MMPs während der Infektion mit pathogenen Mykobakterien, einschließlich MAP, hochreguliert werden (142,198). MMPs regulieren eine Vielzahl von Nicht-Matrix-Substraten wie Chemokine, Zytokine und

Wachstumsfaktoren (151,154). Sie können Entzündungen durch direkte proteolytische Prozessierung von entzündlichen Zytokinen entweder stimulieren oder aufrechterhalten (155). Daraus ist ersichtlich, dass die Bedeutung der MMPs für die Pathogenese der CED sehr komplex und vielschichtig ist.

1.4.3 Untersuchte Matrix-Metalloproteinasen

MMP-2 (Gelatinase A)

MMP-2 ist eine Typ IV-Kollagenase. Der strukturelle Aufbau der MMP-2 ist ähnlich dem der MMP-9. Diese beiden Gelatinasen sind in vielen Aspekten ähnlich, haben aber unterschiedliche Substratspezifitäten. MMP-2 wird physiologisch in den Fibroblasten gebildet und ist in viele physiologische Prozesse, wie Proliferation, Adhäsion und Migration involviert. Außerdem ist MMP-2 verstärkt an der proteolytischen Spaltung der EZM während der Tumorinvasion beteiligt und wird vor allem von den tumornahen Stromazellen gebildet. Dies konnte anhand mehrerer Studien belegt werden, die die vermehrte Expression in Zelllinien, bei inflammatorischen Reaktionen und bei kolorektalen Karzinom im Vergleich zum normalen Darmgewebe zeigen (161,199).

MMP-7 (Matrilysin)

MMP-7 zeichnet sich durch ein Fehlen der Hämpexin-Domäne aus. MMP-7 ist in der Lage, Kollagene, Elastin, Proteoglykane, Laminin, Fibronectin und Casein zu degradieren (199,200). Beim Vorliegen einer CED ist die Expression von MMP-7 deutlich erhöht, was zur Annahme führt, dass MMP-7 für die Wundheilung von Bedeutung ist und dabei die Entzündungsaktivität widerspiegelt (201,202). Adenomatöse Kolonpolypen, UC und CD wiesen eine vermehrte Expression von MMP-7 und MMP-13 auf (203,204). In Tierversuchen konnte die Expression von MMP-7 durch den Kontakt mit Bakterien stimuliert werden (205).

MMP-9 (Gelatinase B)

Wie die MMP-2 (Gelatinase A) ist MMP-9 ebenfalls eine Typ IV-Kollagenase und an der Degradation der EZM während der Tumorinvasion beteiligt sowie in eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen involviert. MMP-9 wird physiologisch in den neutrophilen Granulozyten und Makrophagen gebildet, aber auch in Tumorzellen bzw. Karzinomzellen vermehrt exprimiert. MMP-9 wird durch verschiedene Entzündungszellen in neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen stark exprimiert. Es scheint die

subendotheliale Basalmembran während des Übertritts der Entzündungszellen vom Gefäßsystem ins umliegende Gewebe zu degradieren. Die durch MMP-9 initiierte Degradation der EZM ist entscheidend bei der Ausbreitung von malignen Tumoren (149,161,162,206).

MMP-13 (Kollagenase 3)

MMP-13 (Kollagenase 3) wird, wie auch MMP-7, überwiegend von den Tumorzellen selbst gebildet. Die wichtigste Funktion liegt in der Spaltung der Kollagene I, II und III. Im gesunden Organismus wird MMP-13 generell sehr wenig exprimiert. Physiologisch wird MMP-13 bei Remodelierungsprozessen im Knochenmark gebildet. MMP-13 ist wie auch MMP-1 und MMP-8 an vielen Entzündungsprozessen beteiligt (199,203,207,208). Rath et al. konnten eine signifikante Expressionssteigerung von MMP-7 und MMP-13 in entzündlich veränderter Darmschleimhaut von CD- und UC-Patienten zeigen (203,204).

MMP-14 (MT1-MMP)

MMP-14 ist eine membranständige Matrix-Metalloproteinase, welche über Aktivierung von MMP-2 die Bestandteile der EZM abbauen kann. Alle MT-MMPs konnten bei Tumorzellen nachgewiesen werden, wobei MMP-14 eine besonders hohe Expression aufwies. MT1-MMPs gelten als Aktivatoren der Gelatinasen und sind an der Degradation von Laminin, Vitronectin, Fibronectin und Proteoglykanen beteiligt (209,210).

2 Zielsetzung

Mykobakterien spielen möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese von Morbus Crohn. Da ein Einfluss von *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) auf CD kontrovers diskutiert wird, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von MAP auf den Darm von MAP-infizierten Mäusen untersucht. In MAP-infizierten Mäusen wurde insbesondere die Modulation der Genregulation von MMPs und TLRs analysiert.

Um die Wirkung von MAP-Bakterien auf die Darm-Histologie zu beurteilen, wurden Mäuse oral oder i.p. mit MAP infiziert. Nach unserer Hypothese könnte MAP in der Lage sein, die Expression von MMPs, TLRs und proinflammatorischen Zytokinen in vivo zu beeinflussen. Der Einfluss einer MAP-Infektion auf die chronische Entzündung sollte über die kolonale Expression von MMPs, TLR-2, TLR-6, IL-1 β , und TNF- α in Mäusen nach MAP-Infektion analysiert werden. Innerhalb dieser Studie wurde speziell untersucht, ob eine orale MAP-Exposition die Expression verschiedener Gene im Kolon von BALB/c-Mäusen in vivo induzieren kann.

In einem 2. Versuchsteil wurden immunkomprimierte Rag2^{-/-}-Mäuse i.p. mit MAP infiziert und erhielten zur Induktion einer Colitis eine Rekonstitution mit verschiedenen T-Zellen. Ziel war die Analyse der T-Zell-abhängigen Modulation von MMPs und TLRs. Durch unsere Experimente wurde eine Situation imitiert, die der Pathogenese von CD und Paratuberkulose sehr ähnlich ist. Durch T-Zell-Rekonstitution der MAP-infizierten immungeschwächten Rag2^{-/-}-Mäuse sollte weiterhin die Beteiligung von T-Zellen an einer MAP-Infektion untersucht und ein potentiell Tiermodell zur Untersuchung von MAP bei Darmentzündungen erstellt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Gewebeproben

A) Orale MAP-Exposition in BALB/c-Mäusen

BALB/c-Mäuse (3-4 Wochen alt) wurden von der Charles River WIGA GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bereitgestellt und unter SPF-Bedingungen in der Tierhaltung des Instituts für Mikrobiologie, Veterinärmedizinische Universität Hannover in Standard-Kunststoff-Käfigen mit freiem Zugang zu Wasser und Standard-Mäusefutter beherbergt. Alle Untersuchungen wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz und unter dem genehmigten Tierversuchsantrag mit dem Aktenzeichen 07/1335 durchgeführt (Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Oldenburg).

Die Darmflora bei jungen Mäusen erfährt während der Entwicklung signifikante Veränderungen, indem ein Übergang von einer Escherichia coli-reichen Mikroflora zu einer Clostridiales/Bacteroidales-reichen Flora von der Stillzeit bis zum Abstillen erfolgt (211-213). Die Mäuse wurden aus diesem Grund zu zwei verschiedenen Zeitpunkten während der Stillzeit und nach der Abstillperiode mit MAP infiziert. Die Mäuse wurden nach dem Zufallsprinzip den folgenden drei Gruppen zugeordnet:

Die erste Gruppe (A) mit 11 Mäusen erhielt 10^8 Colony-forming units (CFU) MAP jeweils am Tag drei, vier und fünf nach der Geburt. Dafür wurde der MAP-Stamm DSM 44135 (214) verwendet, der von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig stammte. Der Stamm weist ein mycobactinabhängiges Wachstum auf und wurde vom nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien (Institut für experimentelle Biologie und Medizin, Forschungsinstitut Borstel) durch Sequenzanalyse des 16S rRNA-Gens als MAP identifiziert.

Die zweite Gruppe (B) mit 7 Mäusen erhielt jeweils 10^8 CFU MAP am Tag 21, 22 und 23. Für die MAP-Aufnahme wurden die kultivierten Bakterien dreimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; 150 mM NaCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 9 mM Na_2HPO_4 und 2,5 mM KCl, pH 7,2) gewaschen und 10^8 CFU MAP in 100 ml PBS über orale Sondenfütterung zugeführt. Alle Mäuse wurden 65 Tage nach der ersten MAP-Aufnahme (jeweils am Tag 68 und 86 nach der Geburt), wie von Heinzmann et al. beschrieben (215), getötet. Zehn BALB/c-Mäuse ohne MAP-Aufnahme wurden getrennt untergebracht und dienten als Kontrollgruppe. Abbildung 9 veranschaulicht

das experimentelle Protokoll. Das Kolon der Mäuse wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

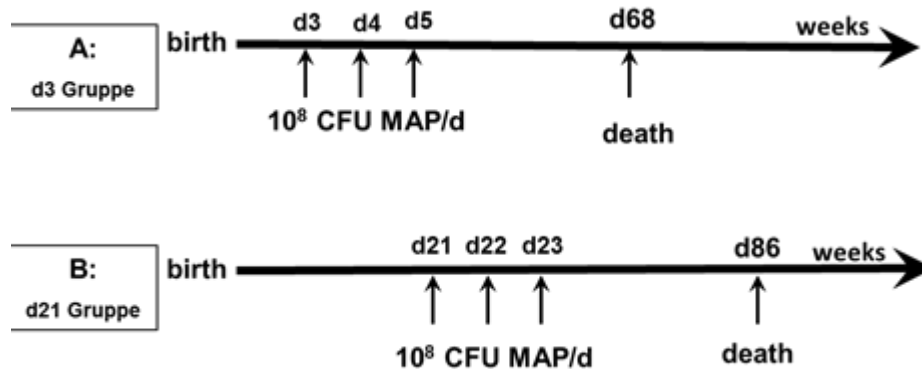


Abbildung 9: Übersicht über das experimentelle Protokoll (oral MAP).

Modifiziert nach (216). Die MAP-Aufnahme wurde durch zwei verschiedene orale Behandlungen (A und B) durchgeführt. (A) Early Exposition: 11 Mäuse wurden täglich mit 10⁸ CFU MAP via Sondenfütterung an Tag drei, vier und fünf nach der Geburt behandelt. Die Tiere wurden 65 Tage später (68 Tage nach der Geburt) getötet. (B) Late Exposition: 7 Mäuse wurden täglich mit 10⁸ CFU MAP am Tag 21, 22 und 23 nach der Geburt behandelt und 65 Tage später getötet (Tag 86 nach der Geburt). 10 nicht-MAP-behandelte Mäuse wurden als Kontrolle verwendet.

B) MAP in T-Zell-rekonstituierten C57BL/6 Rag2^{-/-} Mäusen

Die untersuchten Gewebeproben stammen aus der Kooperation mit dem Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Molekulare Immunologie, Braunschweig, AG Siegfried Weiss. Die Gewebeproben stammen von Rag2^{-/-}-Mäusen, die mit unterschiedlichen T-Zellen rekonstituiert und mit MAP infiziert und im Zeitraum von Mai 2010 bis Dezember 2010 vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung geliefert wurden. Bei den Geweben handelt es sich um Dickdarm- und Dünndarm-Abschnitte der jeweiligen Mäuse-Gruppen.

Alle Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert. Die folgenden Angaben (persönliche Mitteilung) über die Behandlung der Tiere, adoptiver Transfer und Rekonstitutionen wurden von Imke Barga, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Molekulare Immunologie, Braunschweig, AG Siegfried Weiss bereitgestellt (217). Im Labor der AG wurden desweiteren auch Tierversuche durchgeführt.

Bakterienkultur

Der MAP Stamm 6783 (DSM44135) wurde an der Tierärztlichen Hochschule Hannover (TiHo) kultiviert. Die Bakterien wurden mehrere Monate bei 37°C in befeuchteter

Atmosphäre in 20 ml Watson-Reid-Medium (5 g/l L-Asparagin; 10 g/l Glukose; 2 g/l Diammonium Citrat; 75 mg/l Ferric Ammonium Citrat; 2 g/l NaCl; 2 g/l KH_2PO_4 ; 1 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 10 mg/l $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 2 mg/l $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$; 63 ml/l Glycerol; 4 g/l Sodium Pyruvat; 2 mg/l Mycobactin J) kultiviert. Für die Infektions-Experimente wurden die Bakterien innerhalb von 14 Tagen in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) verwendet. Unmittelbar vor der Infektion wurden die Bakterien abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Um einzelne Bakterien zu erhalten, wurden sie 15 Min. mit 3 mm Glasperlen gemischt. Die optische Dichte wurde bei 600 nm gemessen. Eine OD_{600} von 0,1 entspricht 10^7 MAP / ml (218).

Tiere

C57BL/6 Rag2^{-/-}-Mäuse wurden in der Tierhaltung des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung (HZI) gezüchtet und unter definierten Pathogen-freien Bedingungen gehalten. Wildtyp (WT) C57BL/6 Mäuse wurden von Janvier (Frankreich) erworben. Alle Tierversuche wurden am HZI an erwachsenen männlichen und weiblichen Mäusen im Alter von 8 bis 12 Wochen durchgeführt. Die intraperitoneale (i.p.) Infektion wurde mit 10^8 MAP in 200 μl PBS durchgeführt. Kontrollmäusen wurde immer jeweils die gleiche Menge PBS inokuliert. Die Mauspflege und die experimentellen Verfahren wurden im Rahmen der Genehmigung der lokalen Behörden, dem Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES), durchgeführt (Genehmigungs-Nummer: 33.11.42502-04-090/08).

Adoptive Transfer-Experimente und Cellsorting

Zwei Gruppen mit jeweils 4 Mäusen wurden i.p. mit MAP beimpft. Zusätzlich wurden zur Kontrolle 2 Gruppen mit 4 Mäusen jeweils i.p. mit PBS beimpft. Nach 4 Wochen wurden eine Gruppe infizierter Mäuse und eine nicht infizierte Gruppe durch adoptiven Transfer rekonstituiert. Die Milz aus naiven C57BL/6-Wildtyp-Mäusen wurde für eine partielle Rekonstitution von C57BL/6 Rag2^{-/-} verwendet. Die Empfänger- und Spender-Mäuse hatten das gleiche Geschlecht. Die folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Milz wurde auf Eis mit IMDM (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland) ergänzt mit 10% hitzeinaktiviertem FCS und 0,25 mM β -Mercaptoethanol gespült. Die Zellsuspension wurde durch eine 50 μm Nylonfilter-Membran (Partec CellTrics 04-0042-2317) filtriert. Zusätzlich wurden die Zellen 7 Min. bei 1000 rpm ($209 \times g$) zentrifugiert. Das Pellet wurde 2 Min. in ACK-Lysebuffer (0,15M NH_4Cl , 10mM KHCO_3 , 0,1mM Na_2EDTA in ddH₂O) lysiert um die roten Blutkörperchen zu entfernen. Die

Reaktion wurde durch Zugabe von Medium gestoppt. Nach der Zentrifugation bei 1000 rpm (209 x g) für 7 Min. wurde das Pellet in PBS mit 25 µl/ml magnetic B cell removal beads (Invitrogen Dynabeads Mouse pan B (B220) 114.41D 4x10⁸ beads/ml) resuspendiert. Die Suspension wurde durch Rotieren für 30 Min. inkubiert.

Um die B Zellen zu entfernen wurde die Suspension für 3 Min. mit einem Magneten (Invitrogen Dynal MPC-50 Magnetic Particle Concentrator 120.24) behandelt. Die restlichen Zellen wurden für 7 Min. bei 1000 rpm (209 x g) zentrifugiert. Das Pellet wurde 7 Min. mit 500 µl 1:500 verdünnten Maus-Serum (Biowest S2160-020) inkubiert, um den Fc receptor zu blocken. Die Lösung wurde bis zu 14 ml mit PBS aufgefüllt und für 7 Min. bei 1000 rpm (209 x g) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml PBS und FcBlock (rat anti mouse CD16/CD32 BD Pharmingen #5531422.4G2 0,01 µg/ml) gelöst und für 7 Min. auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden 1:1 mit Antikörper-Lösung gemischt und für 15 Min. im Dunkeln inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurde die Lösung bis 14 ml mit PBS aufgefüllt und 7 Min. bei 1000 rpm (209 x g) zentrifugiert. Die Zellen wurden durch einen 30 µm Nylonfilter (Partec CellTrics 04-0042-2316) filtriert. Unmittelbar vor dem Sorting wurden die Zellen mit PI (Sigma P4170, 0,5 µg/ml) oder DAPI (Sigma 9564, 10µg/ml) für die Lebend/Tod Abgrenzung inkubiert. Abhängig von dem Experiment wurden die folgenden Zellpopulationen mittels FACSAriaII cell sorter (Becton Dickinson, NJ, USA) sortiert. Für diese Daten wurde die FACSDiva (Becton Dickinson) Software genutzt, um folgende Populationen zu sortieren:

CD3⁺CD19⁻CD11c⁻CD4⁺CD45RB^{low/int} (CD4⁺CD45RB^{lo/int} T cells),
CD3⁺CD19⁻CD11c⁻CD4⁺CD45RB^{high} (CD4⁺CD45RB^{hi} T cells),
CD3⁺CD19⁻CD11c⁻CD8⁺ (CD8⁺ T cells).

Für die Rekonstitutions-Experimente wurden folgende Antikörper verwendet:

Hamster anti-Maus CD3e 145-2C11 PE (BD Pharmingen 20 ug / ml),
Ratte anti-Maus-CD19 1D3 APC (BD Pharmingen 2 pg / ml),
Hamster anti-Maus CD11c N418 PECy7 (eBioscience 6,7 pg / ml),
Ratte anti-Maus-CD4 RM4-5 APCeFlour780 (eBioscience 10 ug / ml),
Ratte anti-Maus FITC CD45RB 16A (BD Pharmingen 1,7 ug / ml),
Ratte anti-Maus CD8a 53-6,7 PacificBlue (eBioscience 10 ug / ml).

Nach dem Sorting wurden die Zellen ausgezählt und die Zellzahl auf 2 x 10⁶ Zellen in 150 µl PBS eingestellt und i.v. injiziert. Das Körpergewicht der Mäuse wurde regelmäßig überwacht. 4 Wochen nach dem adaptiven Transfer wurden die Mäuse getötet und die Organe wurden für die weitere Analyse entnommen.

Speziell für unsere Untersuchungen wurden das Kolon (Mitte) und der Dünndarm (Endstück) für weitere Untersuchungen verwendet. Abbildung 10 veranschaulicht das experimentelle Protokoll. Rag2^{-/-} CD4⁺CD45RB^{lo/int} und Rag2^{-/-} CD4⁺CD45RB^{hi} sowie Rag2^{-/-} CD8⁺ Mäuse Gruppen wurden durch diese Experimente gebildet, die jeweils folgende Untergruppen aufwiesen:

1. **RAG2^{-/-}** (Kontrolle mit PBS behandelt)
2. **MAP infiziert**
3. **Rekonstituiert** (CD4⁺CD45RB^{lo/int}, CD4⁺CD45RB^{hi}, CD8⁺)
4. **MAP infiziert und rekonstituiert**



Abbildung 10: Übersicht über das experimentelle Protokoll (i.p. MAP).

C57BL/6 Rag2^{-/-} Mäuse wurden i.p. mit 10⁸ MAP infiziert. Die Rekonstitution erfolgte i.v. mit den jeweiligen T-Zellen (2 x 10⁶ Zellen). Nicht-MAP behandelte Mäuse wurden als Kontrolle verwendet.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA Isolation

Materialien und Lösungen

- RNeasy Mini Kit ® von Qiagen (Hilden, Katalog nr. 74106)
TRizol®Reagenz, Invitrogen, Karlsruhe
- [a] Zentrifuge Mikro 200R von Hettich, 78532 Tuttlingen
- [b] Pufferlösung: Bestehend aus Buffer RLT (Quiagen) und Mercaptoethanol (Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe) im Verhältnis 1 ml RLT und 10 l -ME
- [c] Homogenizer: Ultra Turrax T8, Ika-Werke, D-79219 Staufen
- [d] Micro Tubes 2ml, PP, REF 72.694.005, Sarstedt, Nümbrecht
- [e] Bulk Beads, 1,4 mm Zirconium oxide beads, Katalog Nr. 03961-1-103, Precellys24, France
- [h] TURBO DNA-free™ Kit, AM 1907; Applied Biosystems
- Chloroform, Isopropylalkohol, Ethanol 75 %

TRizol®Reagenz

Das Gewebe der BALB/c-Mäuse mit einer oralen MAP-Exposition wurde mittels TRizol®Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) isoliert, entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Das Darmgewebe wurde in flüssigem Stickstoff gemörsernt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde den Proben 0,2 ml Chloroform/ml Trizol zugesetzt und wiederum 2 bis 3 Min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben für 15 Min. bei 12.000 g (2-8°C) zentrifugiert [a] (siehe Angaben in Materialien und Lösungen). Es entstanden 3 Phasen, unten eine rote Phenol-Chloroform-Phase, eine mittlere Interphase, eine obere farblose wässrige Phase, die die RNA enthielt. Diese wässrige Phase wurde in sterile Eppendorf-Tubes überführt. Daraufhin wurden die Proben mit Isopropylalkohol (0,5 ml Isopropylalkohol/1ml Trizol) versetzt und 10 Min. bei RT inkubiert sowie erneut 10 Min. bei 12.000 g (2-8°C) zentrifugiert. Der Überstand der Proben wurde komplett verworfen und das entstandene Zellpellet mit 75%igem Ethanol (1 ml Ethanol/ml Trizol) gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation bei 12.000 g (2-8°C) für 5 Min. konnte der Überstand erneut abpipettiert werden, ohne das Pellet zu beschädigen bzw. abzusaugen. Anschließend wurden die Proben 15 bis 20 Min. unter sterilen Bedingungen getrocknet. Nach Zugabe von 30 µl RNase freiem Wasser (Qiagen) zu den trockenen Zellpellets, wurden diese dann 10 Min. bei 55-60°C inkubiert. Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

RNeasy Mini Kit

Für die RNA Isolierung wurde das Gewebe der C57BL/6 Rag2^{-/-}-Mäusen mit Hilfe des RNeasy Mini Kit® von Qiagen nach Herstellerangaben mit den Lösungen des Kits (sofern Firma nicht anders angegeben) behandelt. Mit dieser Methode kann die RNA, die aus jeweils mehr als 200 Basen besteht, an die RNeasy®-Membran gebunden und isoliert werden. Es kommt zu einer Anreicherung von mRNA, da die meisten anderen RNA-Moleküle, wie zum Beispiel rRNA und tRNA, weniger Nukleotide besitzen und nicht gebunden werden. Die bei -80°C gelagerten Darmproben wurden in 600 µl einer Pufferlösung (RLT/Mercaptoethanol-Gemisch [b]) gegeben und in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube mechanisch mittels Ultra Turrax [c] oder in Micro Tubes [d] mit Hilfe von Bulk Beads von Precellys 24 [e] homogenisiert. Die Pufferlösung inaktiviert mit Hilfe von Guanidin-Isothiocyanat die in den Biopsien enthaltenen RNasen. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurde das Lysat ggf. in den Schredder der Firma Qiagen gegeben und für 3 Min. bei 14.000 rpm und RT zentrifugiert [a]. Der Schredder wurde verworfen. Danach wurden 600 µl 70% Ethanol auf das Lysat gegeben und gemischt. Dadurch erreichte man die Ausfällung der Nukleinsäuren. Die Mischung wurde auf die RNeasy Spin Column®/Säule aufgetragen und für 15 sec. bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die in der Probe enthaltene RNA war anschließend an die Membran der Spin Column gebunden. Das Zentrifugat wurde verworfen und 700 µl RW1 Buffer (Qiagen) wurden auf die RNeasy Spin Column® pipettiert und 15 sec. bei 10.000 rpm zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl des Ethanol-Waschpuffer (RPE). Danach wurde für 2 Min. bei 10.000 rpm zentrifugiert. Nach Abgießen des Zentrifugates erfolgte eine 1 minütige Trockenzentrifugation. Bei dem trocken zentrifugierten Spin Colum wurde das Auffanggefäß verworfen und die Säulen in sterile verschließbare 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zum Schluss wurde die RNA mit 30µl RNase-freiem Wasser nach 5 minütiger Wartezeit bei 10.000 rpm 1 Min. eluiert. Die so gewonnene RNA wurde bei -80°C gelagert. Abbildung 11 zeigt schematisch die einzelnen Schritte der RNA-Isolierung.

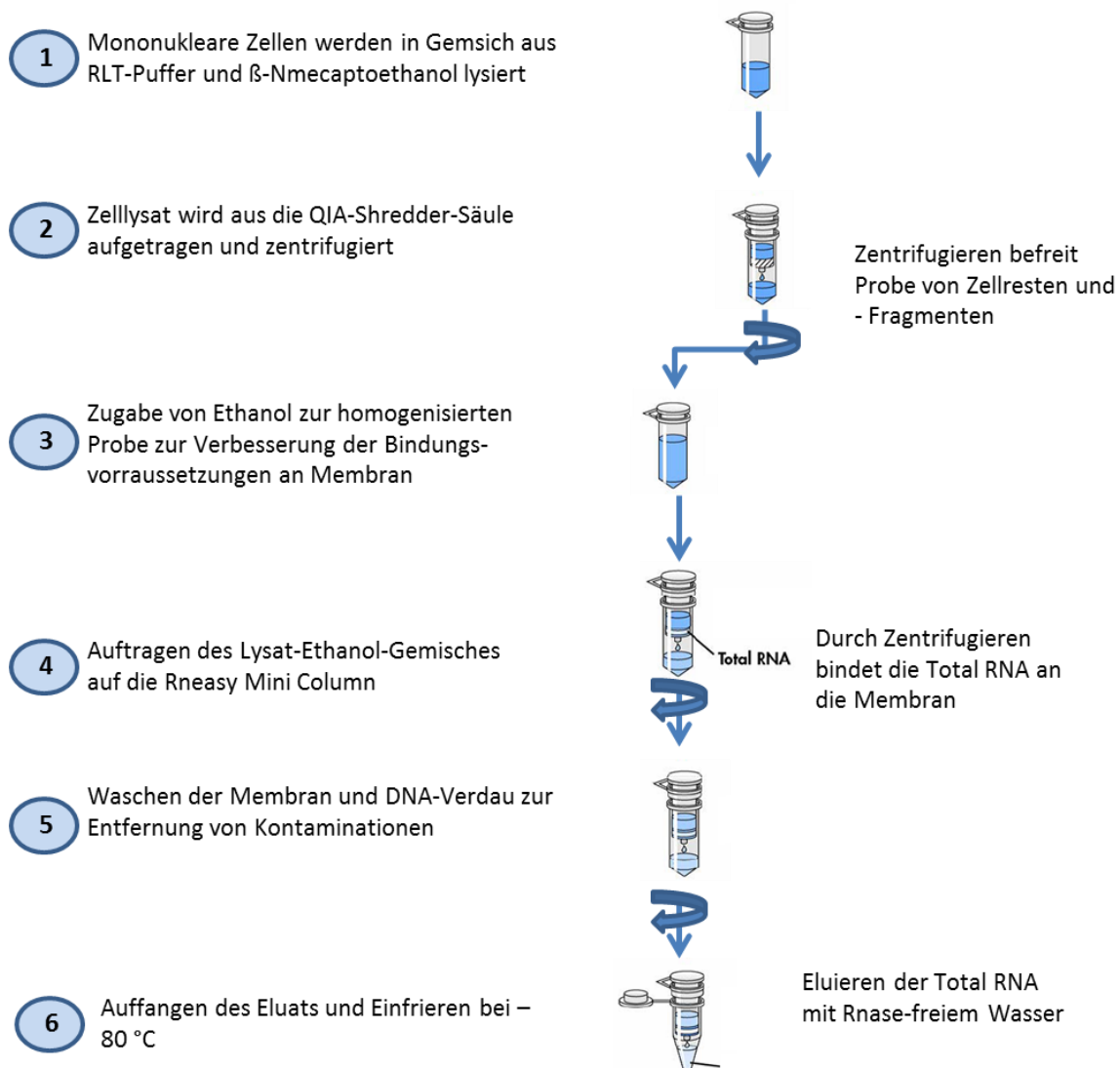


Abbildung 11: Prinzip der RNA-Isolation.

Modifiziert nach Handbuch aus RNeasy Mini Kit® von Qiagen (Hilden, Katalog nr. 74106).

DNA-Verdau

Um eventuellen Verunreinigungen der RNA-Probe durch unspezifische genomische DNA entgegenzuwirken, welche dann später die Ergebnisse der PCR beeinflussen können, wurde ein optionaler DNA-Verdau nach der RNA-Isolierung mit Hilfe des TURBO DNA-free™ Kit [h] durchgeführt. Hierbei wird die kontaminierende DNA aus RNA-Präparationen entfernt. TURBO DNase ist eine ausgereifte Version von Wildtyp-DNase I mit 350% größerer katalytischer Effizienz. TURBO DNase weist eine deutlich höhere Affinität zu DNA als herkömmliche DNase auf. Die genaue Vorgehensweise ist dem Handbuch von Turbo DNase free Kit, AM 1907; Applied Biosystems zu entnehmen.

Für die Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA wurden je 1 µl der Proben mit Hilfe von NANO-Drop (ND 1000 Spectrophotometer, Fa. Thermo Scientific) bei 260 nm gemessen. Für die Reinheitsbestimmung erfolgte die Messung nochmals bei 280 nm, um so Verunreinigungen durch Proteine zu erfassen. Der Quotient Absorption bei 260/Absorption bei 280 (OD260/OD280) gibt den Reinheitsgrad an. Der Wert sollte zwischen 1,6 – 2,1 liegen.

Daraufhin wurden die RNA-Proben entweder bei -80°C gelagert oder zur cDNA-Synthese genutzt. Die Konzentration der Gesamt-RNA errechnet sich wie folgt:

$$C_{RNA} = (A_{260} - A_{LW}) * 40 * V$$

C_{RNA} = RNA-Konzentration in µg/ml

A_{260} = Absorption der Probe bei 260 nm

A_{LW} = Absorption des Leewertes Probe bei 260 nm

40 = Multiplikationsfaktor

V = Verdünnungsfaktor

3.2.2 Synthese komplementärer DNA

Materialien und Lösungen

[a] iScript cDNA Synthesis Kit, Bio Rad Laboratories, CA

[b] MMLV Reverse Transkriptase, Thermo, Thermo Fisher Scientific, Bonn

[c] Thermocycler T3, Biometra, Göttingen

Die Synthese der cDNA ist eine Voraussetzung für die Durchführung der PCR. Bei der cDNA-Synthese wird die mRNA aus der Gesamt-RNA selektiv in komplementäre DNA umschrieben. Die cDNA ist eine komplementäre DNA und entspricht als Kopie der mRNA der DNA, die die gesuchte mRNA kodiert.

Die RNA wurde mit Reverse Transkriptase behandelt, die die einzelsträngigen RNA in doppelsträngige DNA umschreibt. Desoxythymidin-Oligonucleotide werden zu der mRNA gegeben, die mit den Poly (A)-Schwänzen hybridisieren und dann als Primer für die Reverse Transcriptase wirken. Die RNA-Menge jeder Probe wird mithilfe der Werte aus der Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA (Umrechnung auf 1 µg) in einem Gesamt-Volumen von 15 µl RNase freiem-Wasser gelöst.

Für die Umschreibung von mRNA in cDNA wurde von jeder Probe 1 µg mRNA benötigt. Die entsprechende Menge in µl wurde in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und diese mit destilliertem H₂O aufgefüllt. Die Synthese von cDNA erfolgte

über Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) Reverse Transkriptase [b] nach dem Protokoll des Herstellers oder mit Hilfe des iScript cDNA Synthesis Kit [a]. Der Reaktionsmix der jeweiligen Firmen wurde wie in Tabelle 3 zu sehen hergestellt und die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte im Thermocycler [c] entsprechend den in der Tabelle beschriebenen Programmen. Die auf diese Weise neu synthetisierten cDNA-Proben wurden bis zur RT-PCR bei -20°C gelagert.

Tabelle 3: Herstellung des Reaktionsmix für die Synthese der cDNA und Programm für den Thermocycler (eigene Darstellung)

| iScript cDNA Synthesis Kit [a] | | MMLV Reverse Transkriptase [b] | |
|-----------------------------------|-------|--|-------|
| 5x iScript reaction mix | 4 µl | 5fach Reaktions-Puffer (mit Mg ²⁺) | 4 µl |
| iScript reverse transcriptase | 1 µl | Primer-Mix (5x diluted oligo-dT) | 1 µl |
| Nuclease-free water | x µl | Random Hexamers (80 ng/µl) | 1 µl |
| RNA template (1 µg total RNA) | x µl | dNTPs, 10 mM, | 1 µl |
| Total volumen | 20 µl | Nuclease-free water | x µl |
| | | RNA template (1 µg total RNA) | x µl |
| | | Total volumen | 20 µl |

| Programm iScript cDNA Synthesis Kit | | Programm MMLV Reverse Transkriptase |
|--|--------|--|
| 25°C | 5 min | 42°C 20 min |
| 42°C | 30 min | 95°C 3 min |
| 85°C | 5 min | Bei – 20 °C wegfrieren |

3.2.3 Realtime-Detektion-PCR

Materialien und Lösungen

- [a] Platinum SYBR Green qPCR Super Mix, Invitrogen, Kat. Nr.: 11733-038
 - [b] Multiplex quantitative PCR- System MX 3000P, Stratagene, Kat.Nr.: 401401
 - [c] MXpro, Corbett Research, Australien
- Primer: Fa. Qiagen, Hilden
Primer: Eurofins MWG Operon, Ebersberg
PCR Strips, Thermo Scientific, Kat. Nr.: 3418
Pipettenspitzen, Fa. Sarstedt
Reaktionsgefäße, Fa. Sarstedt
RNase-freie Pipettenspitzen mit Filter, Fa. Greiner, Bio-One, Essen

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch: Polymerase Chain Reaction, PCR) dient der Amplifizierung eines spezifischen DNA-Abschnittes, d.h. ein genau definierter Teil eines DNA-Strangs wird vervielfältigt. Mit dieser Technik kann man die Genexpression selbst kleinster Genmengen auf RNA-Ebene genau bestimmen. Die Vervielfältigung wird durch Zugabe des Enzyms DNA-Polymerase ermöglicht. Die DNA-Polymerase bindet sich spezifisch an einen DNA-Einzelstrang und synthetisiert mit Hilfe von Primern einen komplementären Strang. Sense oder Antisense Primer wurden mit einer Endkonzentration von 6 μM (Fa. Qiagen, Hilden und Eurofins MWG Operon, Ebersberg) genutzt. In mehreren Zyklen werden diese Doppelstränge durch Erhitzen wieder getrennt und neue Komplementärstränge synthetisiert. Die Entstehung der doppelsträngigen DNA wird durch unspezifische Einlagerung der Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR Green* [a] verfolgt, indem das Fluoreszenzsignal immer am Ende der 72°C-Phase bei der Wellenlänge 521 nm gemessen wird. SYBR lagert sich in die fertig synthetisierten doppelsträngigen DNA-Moleküle ein und sendet von dort aus Fluoreszenzsignale aus. Durch die Messung der Fluoreszenz während der Reaktion erhält man am Ende eine exponentielle Kurve, welche die Menge an amplifizierter DNA darstellt. Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional zur gebildeten Menge an doppelsträngiger DNA. In jedem Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der in den Templates enthaltenen DNA-Kopien und es erfolgt bis zur Sättigungsgrenze ein exponentieller Anstieg.

Für die SYBR Green PCR wurden 0,5 μl der synthetisierten cDNA mit 12 μl des Mastermixes vorsichtig in einem PCR-Gefäß vermischt. Der Mastermix bestand aus folgenden Komponenten:

Tabelle 4: Mastermix für PCR

| Mastermix | Volumen µl |
|--|---------------------|
| SYBR GREEN/Rox | 6,3 |
| Primer (Qiagen) oder Primer (Eurofins MWG Operon) | 1,25 0,25 / 0,25 |
| dd H ₂ O | 4,45 |

Für die PCR wurde folgendes Programm im "Multiplex quantitative PCR-System MX 3000P" [b] von Stratagene durchgeführt:

1. Denaturierung bei ca. 95°C für 10 Min.
(Zerstörung unerwünschter Enzyme und Aktivierung der Taq-Polymerase)
2. Denaturierung bei ca. 95°C für 30 sec.
(Auftrennung des Doppelstrangs)
3. Primer-Hybridisierung bei spezifischer Annealing-Temperatur (30 sec. 57°C)
4. Polymerisation bei 72°C für 30 Min. (Elongation durch Polymerase, Synthese)

Tabelle 5: Programmablauf der Real-time PCR

| <u>Temp.</u> | <u>Dauer</u> |
|--------------|-----------------------|
| 95°C | 10 Min. |
| 95°C | 10 sec. |
| 57°C | 30 sec. Annealing |
| 72°C | 10 sec. Elongation |
| 95°C | 1 Min. |
| 55°C | 30 sec. |
| 95°C | 30 sec. |

Um sicherzugehen, dass wirklich nur die gewünschten Gensequenzen und keine unspezifischen DNA Sequenzen während der PCR amplifiziert wurden, wurde am Ende eine Dissoziationskurve (Schmelzkurve) erstellt, die auf dem grundlegenden Prinzip beruht, dass unterschiedliche Gensequenzen unterschiedliche Schmelztemperaturen haben. Dadurch konnte überprüft werden, ob andere unerwünschte Nebenprodukte das Endergebnis verfälschen. Diese Nebenprodukte

haben andere Schmelzpunkte, als die zu untersuchende DNA. Es entstehen dadurch zusätzliche Peaks in der Dissoziationskurve. Der Punkt mit der höchsten Steigung in der Amplifikationskurve wird als Threshold-Wert (CT Wert) bezeichnet. Er bezeichnet den Zyklus, bei dem sich das Fluoreszenzsignal am deutlichsten von der Hintergrundfluoreszenz unterscheidet. Dabei ist der Threshold umso größer, je kleiner die anfangs vorhandene cDNA-Menge war. Alle Analysen wurden doppelt durchgeführt (Doppelmessungen), um kleine Pipettierfehler auszugleichen. Anschließend wurde der Mittelwert der Ergebnisse gebildet.

Für jeden Versuch wurde das Housekeeping-Gen r18S (durch laborinterne Vorversuche) bestimmt und später bei der Auswertung als Vergleichsprobe genutzt, da es unabhängig vom physiologischen Status der Gewebe ist und eine konstante Expression aufweist. Zur Sicherung der Qualität der PCR wurde eine Non Template Control (NTC, Reaktionsansatz ohne cDNA) pro Lauf verwendet. Aus der Differenz der Threshold-Werte zwischen dem zu messenden Gen und dem Housekeeping-Gen ergibt sich eine Quantifizierung der Genexpression. Die Eigenschaften wie Primersequenzen und die Annealing-Temperaturen der Mäuseprimer für die PCR sind in Tabelle 3 dargestellt. Unter Verwendung des Programms MXpro [c] wurden die CT Werte (cycle threshold) ermittelt und die Amplifikationskurven bewertet. PCR-Produkte wurden auf 2%-igen Agarosegelen getrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung das Erscheinungsbild eines einzelnen Produktes von korrekten Molekülgröße bestätigen.

Die relative mRNA-Konzentration wurde mittels der $\Delta\Delta Ct$ -Methode berechnet (219,220):

$$\Delta\Delta Ct = Ct_{r18S} - Ct_{Zeilgen}$$

Tabelle 6: Verwendete Primer, Sequenzen und Annealingtemperaturen

| Primer | Nukleotidsequenz 5'→3' | Annealing- temperatur |
|----------|--|--------------------------|
| 18 s RNA | Qiagen Cat. QT01036875 | 57°C |
| r18S | forward 5' - gaa taa tgg aat agg acc gcg g -3' reverse 5' - gga act acg acg gta tct gat c -3' | 57°C |
| MMP-2 | Qiagen Cat. QT00116116 | 57°C |
| MMP-2 | forward 5' - gga tac cca ttt gat ggc aag g -3' reverse 5' - gaa gcc ata ctt gcc atc ctt c -3' | 60°C |
| MMP-7 | Qiagen Cat. QT00110012 | 57°C |
| MMP-7 | forward 5' - gct ctc aga atg tgg agt atg c -3' reverse 5' - cag aga gtg gcc aaa ttc atg g -3' | 57°C |
| MMP-9 | Qiagen Cat. QT00108815 | 57°C |
| MMP-9 | forward 5' - gtg ttc ccg ttc atc ttt gag g -3' reverse 5' - gaa acc cca ctt ctt gtc agt g -3' | 57°C |
| MMP -13 | Qiagen Cat. QT00111104 | 57°C |
| MMP -13 | forward 5' - cag ttt ctt tat ggt cca ggc g -3' reverse 5' - cat cca cat ggt tgg gaa gtt c -3' | 57°C |
| TIMP-1 | Qiagen Cat. QT00996282 | 57°C |
| TIMP-1 | forward 5' - gct aaa ttc atg ggt tcc cca g -3' reverse 5' - gag aaa gct ctt tgc tga gca g -3' | 57°C |
| TIMP-2 | Qiagen Cat. QT00138558 | 57°C |
| TNF-α | Qiagen Cat. QT00104006 | 57°C |
| IL1-β | Qiagen Cat. QT01048355 | 57°C |
| TLR-1 | Qiagen Cat. QT00099617 | 57°C |
| TLR-2 | Qiagen Cat. QT00129752 | 57°C |
| TLR-3 | Qiagen Cat. QT00122983 | 57°C |
| TLR-6 | Qiagen Cat. QT01078658 | 57°C |
| TLR-9 | Qiagen Cat. QT01748901 | 57°C |

3.2.4 Zymographie

Die Zymographie ist sehr gut zum qualitativen Nachweis der aktiven Enzyme geeignet. Proteolytische Aktivität von MMPs wurde unter der Verwendung einer Gelatinezymographie untersucht, wie bereits beschrieben (221,222). Die Zymographie basiert auf einer Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), dabei werden die durch das Gel wandernden Proteine mit negativ geladenem Natriumdodecylsulfat (SDS) beladen und dann ihrer Größe nach aufgetrennt. Das Zymographie-Gel enthält zusätzlich Gelatine, so dass über Nacht inkubierte Gelatinasen in den Proben das Substrat enzymatisch abbauen können. Durch die abgebaute Gelatine bilden sich in dem ansonsten blau gefärbten Gelatinegel helle Banden, die die Aktivität der Gelatinasen beschreiben.

1 mg/ml Gelatine wurde in einem 7,5%igen PAGE-Gel polymerisiert. Zur Polymerisation wurden Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethyläthylendiamin (TEMED) hinzugefügt. Dabei war daran zu denken, dass TEMED und APS als Katalysatoren die Reaktion in Gang setzen und nach deren Zugabe nur wenig Zeit blieb, bevor das Gel fest wurde (ca. 20 Min.). Das Gel wurde in den Gießstand gegeben und mit 1 cm Isobutanol überschichtet. Anschließend konnte das Sammelgel (Herstellung des Sammelgels: 4 ml H₂O mit 635 µl Acrylamid, 313 µl 2 M Tris/HCl pH 6,8, 25 µl SDS (20 %), 40 µl APS (20%) und 5 µl TEMED) darauf gegeben werden und ein Kamm zur Bildung der gewünschten Taschenanzahl (Aufnahme der Proben) wurde vorsichtig in das Gel eingesetzt. Nach 20 Min. war das Sammelgel fest und das Gel wurde in das Elektrophoresegerät eingespannt. Das Gel wurde in der Elektrophorese-Kammer mit Laufpuffer überschichtet. 10 µg Protein aus Gewebelysaten jeder Gruppe wurde auf das Gel geladen.

In der Elektrophoresekammer wurde eine Spannung von 25–30 mA für ca. 2 h angelegt und die Proteine jedes Lysats trennten sich nach ihrem Molekulargewicht auf. Zur Identifikation der Proteine lief ein Marker mit Proteinen von genau definiertem Molekulargewicht mit. Nach der Elektrophorese wurde SDS zweimal mit TRIS gepufferte Waschlösung (pH 7,5), welches 1% Triton-X10 enthält, für 15 Min. gewaschen. Die Auftrennung der Proteine fand bei einer Temperatur von 4 °C statt, bei der die MMPs inaktiv sind. Nach der Proteintrennung wurde das Gel über Nacht bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert, bei der die Enzyme aktiv werden. Im aktiven Zustand spalteten dadurch die MMPs die Gelatine, die im Gel enthalten sind. Nach Inkubation über Nacht in 50 mM Tris (pH 7,5) mit 150 mM NaCl und 5 mM CaCl₂, wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blue Färbelösung (1% in 50% Methanol, 20%

Essigsäure, 30% Wasser) angefärbt und durch 3-6 Waschschritten mit kochendem Wasser entfärbt.

Aus dem Vorhandensein einer Bande konnte man qualitativ den Schluss ziehen, dass MMPs an dieser Stelle vorhanden sind und aus der Breite und der Intensität der Bande kann man semiquantitativ auf die Menge an MMPs schließen (je breiter und je intensiver entfärbt die Bande, desto größer ist die Menge an MMPs). Die Identifikation der MMPs konnte anhand des Zymographiemarkers und des Größenstandards durchgeführt werden.

3.3 Histologische und Immunhistologische Färbungen

Materialien und Lösungen

[a] Tissue-tek, Sakura-Firetek, Zoeterwoude, Niederlande

[b] Kryotom CM 1850 UV, Leica, Wetzlar

[c] Super Frost Ultraplus Objektträger, R. Langenbrinck

[d] M.O.M Block, Vector Lab, PK-4600

[e] 5% goat/horse Serum, Eugen, OR, USA

[f] Blockier Mix: Bestehend aus 5 % BSA, 0,1 % Coldfish Gelatine, 0,1 % Triton X-100 und 0,05 % Tween gelöst in PBS (1x) mit pH 7,4

[g] DAPI: 1 µl Stocklösung (1µM) + 10 ml PBS (x1)

PBS (10x): 80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g Na₂HPO₄ (di-Natriumhydrogenphosphat) x 2 H₂O und 2,45 g KH₂PO₄ in 950 ml aqua dest. gelöst und auf Gesamtvolumen 1000 ml mit aqua dest. aufgefüllt + Spatelspitze Thimersosal

PBS (1x): 100 ml PBS (10x) in 900 ml aqua dest. gelöst; pH-Wert 7,4

Waschlösung: PBS (1x) mit 0,05 % Tween

Dako Fluoreszenz-Medium: Fluorescent Mounting Medium, S3023; Dako

Geräte

Laborwaage, Faust, Klettgau

pH-Meter, Metrohm, Zofingen, Schweiz

Fluoreszenz-Mikroskop Leitz DMRB, Leica

Aceton, Firma Merck, Darmstadt

Methanol, Apotheke der JLU Gießen, Gießen

Tween 20, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Für die immunhistochemische Untersuchung wurden Proben ausgewählt, die eine besonders differenzierte Regulation der Zielgene (PCR) in gesundem und krankem Gewebe gezeigt haben. Die ausgewählten Proben wurden in Tissue-tek [a] bei -80°C eingefroren und über Nacht in -20°C gelagert. Anschließend wurden die gefrorenen Proben am Kryotom [b] in 3 µm dicke Schnitte geschnitten und auf einen Objektträger [c] gegeben. Anschließend wurden diese bei -20°C gelagert. Als Kontrolle wurden gereinigte unspezifische Isotyp-IgG der gleichen wie für die Färbungen verwendeten Spezies verwendet.

Immunhistologische Färbungen von MAP wurden gegen das Epitop MAP 1775 gerichtet, welches ausschließlich in den Membranen von in die Schleimhaut eingewanderten MAP gefunden wurde (223). Für die Färbungen wurde ein synthetisches MAP 1775 Gen eingesetzt (Mr. Gene GmbH, Regensburg, Deutschland). Das Gen wurde in den Expressionsvektor pGEX-1LambdaT (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) kloniert. Das rekombinante GST-Fusionsprotein wurde durch SDS-PAGE und anschließend durch Elektroelution, wie von Meens et al. (224) beschrieben, gereinigt. Das synthetische MAP 1775 Gen wurde mit freundlicher Unterstützung von G-F. Gerlach und den Kollegen, Hannover, vollständig aufbereitet zur Verfügung gestellt (224).

Dieses Antigen wurde verwendet, um die Antikörper in Kaninchen zu erhöhen (Seqlab, Göttingen, Deutschland). Das daraus resultierende Serum wurde direkt für die Immunfluoreszenz in einer Verdünnung von 1:500 verwendet (Rabbit anti MAP 1175). Die immunhistochemischen Färbungen wurden ebenso für verschiedene MMPs und TLRs durchgeführt. Die Co-Färbungen wurden mit T-Lymphozyten (CD45, CD3, CD8) und spezifischen Marken für Makrophagen (F4/80) und DAPI-Kernfärbung (4,6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid, Sigma Aldrich, München) entsprechend der folgenden Arbeitsschritte durchgeführt:

1. Die Gefrierschnitte wurden 2 Min. in einer -20°C kalten Lösung aus Aceton und Methanol (Verhältnis 1+1) fixiert.
2. Die fixierten Kryoschnitte wurden 3x2 Min. in PBS (1x) plus 0,05% Tween gewaschen. Dazu wurden die Objektträger in eine Küvette gegeben und die Waschlösung nach jeweils 2 Min. ersetzt.
3. Auf die Objektträger wurden jeweils 30-50 µl Blockier-Lösung gegeben und bei Raumtemperatur für 30 Min. dunkel gelagert. Spezifisch für Mausgewebe wurde ein Blockier Mix [f] und noch ein zusätzlicher M.O.M Block [d] (mouse on mouse) mit „Goat á mouse FAB“ Fragmenten durchgeführt.

4. Die Objektträger wurden nach dem Blockiervorgang vorsichtig auf Papiertüchern dekantiert und 3x2 Min. in PBS (1x) plus 0,05% Tween gewaschen, sowie um die Schnitte herum abgetupft.
5. Die jeweils zu untersuchenden Erst-Antikörper wurden dazu pipettiert. Für die Kontrollen wurden die jeweiligen IgGs im Verhältnis 1:11000 in 1x PBS gelöst und als negative Kontrolle verwendet. 40 µl der jeweiligen Lösung (Verdünnungen in Tab. 4) wurden auf die Objektträger pipettiert und danach über Nacht bei 4° C in der feuchten Kammer inkubiert.
6. Im nächsten Schritt wurde der Alexa Sekundärantikörper Alexa (488/568) zur Färbung aufgetragen. Dieser wurde im Verhältnis 1:1000 mit 5% goat/horse Serum [e] in PBS angesetzt und 40 µl pro Schnitt dazu pipettiert und 20 Min. in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.
7. Nachdem die Objektträger dreimal 2 Min. in der Waschlösung gewaschen und um den Schnitt herum abgetupft wurden, konnte der zweite Antikörper für die zweite Färbung (gegen Lymphozyten bzw. Endothelien oder MAP) aufgetragen werden. 40 µl der jeweiligen Lösung (Antikörper & IgGs) wurden auf die Objektträger pipettiert. Die Objektträger wurden dann über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert.
8. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Objektträger vorsichtig abgeklopft und 3x2 Min. in der Waschlösung gereinigt. Danach wurde mit dem Alexa (488/568) der zweite Antikörper zur Färbung der Antikörper aufgetragen. Es erfolgte erneut eine 20 minütige Inkubation bei RT in der feuchten Kammer.
9. Die Objektträger wurden 3x2 Min. in die Waschlösung gegeben und danach vorsichtig mit Papiertüchern um den Schnitt herum getrocknet. Danach erfolgte die Färbung der Zellkerne mittels DAPI [g]. Dazu wurde jeweils 30-50 µl DAPI-Lösung auf die Kryoschnitte gegeben und 3 Min. inkubiert. Abschließend wurden die Objektträger wieder 3 x 2 Min. gewaschen.
10. Die Objektträger wurden nun gründlich und vorsichtig um die fertig gefärbten Kryoschnitte herum abgetrocknet. Es wurde zügig jeweils ein Tropfen Dako Fluoreszenz-Medium aufgetropft und das Objektglas aufgelegt. Die jetzt fertigen Präparate konnten im Dunkeln getrocknet und gelagert werden.

Tabelle 7: Übersicht über die bei den Färbungen verwendete Antikörper und Substanzen

| Antikörper | Verd. | Hersteller | Katalognr. |
|--|--------------|-------------------------------------|--------------------------|
| Rabbit anti MAP 1175 | 1:500 | Mr. Gene GmbH, Regensburg | |
| Goat anti MMP-9 | 1:50 | R&D, Wiesbaden | AF909 |
| Mouse anti MMP-13 | 1:50 | Calbiochem | IM44L-100UG |
| Rat anti CD45 ⁺ | 1:50 | BD, Heidelberg | 550539 |
| Rat anti F4/80 | 1:50 | BMA Biomedicals, Augst (Schweiz) | T-2006 (Lot 12PO0504) |
| Rat anti TLR-2 | 1:50 | AbD Serotec, Düsseldorf | AHP1635 |
| Goat anti rabbit Alexa 568 | 1:1000 | Molecular Probes, Invitrogen | A21069 |
| Goat anti mouse Alexa 568 | 1:1000 | Molecular Probes, Invitrogen | A11019 |
| Goat anti rat Alexa 568 | 1:1000 | Molecular Probes, Invitrogen | A11077 |
| Goat anti rat Alexa 488 | 1:1000 | Molecular Probes, Invitrogen | A11006 |
| Goat anti mouse Alexa 488 | 1:1000 | Molecular Probes, Invitrogen | A11017 |
| Donkey anti goat Alexa 488 | 1:1000 | Molecular Probes, Invitrogen | A11055 |
| Isotyp rat IgG | 1:11000 | Jackson Immuno Res. Lab | 012-000-003 |
| Isotyp goat IgG | 1:11000 | Jackson Immuno Res. Lab | 005-000-003 |
| Isotyp rabbit IgG | 1:11000 | Jackson Immuno Res. Lab | 011-000-003 |
| Isotyp mouse IgG | 1:2800 | Jackson Immuno Res. Lab | 015-000-003 |
| AffiniPure Fab Fragment Goat Anti-Mouse IgG (HL), | 1,3 mg/ml | Dianova | 115-007-003 |

3.4 Statistische Auswertung

Die Daten der PCR wurden mit Hilfe von Microsoft Office Excel (Version 2003) übersichtlich als Liste dargestellt und mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) ausgewertet. Die Ergebnisse wurden für eine Analyse mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft und durch Histogramme dargestellt.

Ob sich die MAP-infizierten Gruppen signifikant von den Kontrollgruppen bzw. ob sie sich untereinander hinsichtlich des Expressionsverhaltens unterschiedlicher Proteine unterscheiden, wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests für nicht-parametrische Gruppen berechnet. Bei dem Mann-Whitney-Test werden zwei gleichwertige, nicht normalverteilte Stichproben verglichen. Der Test eignet sich in diesem Fall als verteilungsunabhängiger Test zum Vergleich der Mediane beider Stichproben.

Die Nullhypothese H_0 lautet: „Die Proben unterscheiden sich nicht.“

Die Alternativhypothese H_1 lautet: „Die Proben unterscheiden sich.“

Dieser Test war geeignet, da die Werte in den Subgruppen nicht sicher normalverteilt waren und teilweise nur sehr kleine Stichproben vorlagen. Die relative Genexpression der MMPs wurde als $\Delta\Delta C_t$, auf das Housekeeping-Gen und die probeninterne Referenzprobe normiert, angegeben (220).

Die Ergebnisse wurden in p-Werte umgerechnet. Hierbei handelt es sich um die Irrtumswahrscheinlichkeit, mit der man gerade noch die Nullhypothese widerlegen kann. Für die Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p < 0,05$) gewählt, die mittels dem Statistikprogramm SPSS (Version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) errechnet wurden. Somit wird von einem statistisch signifikanten Gruppenunterschied gesprochen, wenn rechnerisch das Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ unterschritten wird. Die signifikanten Unterschiede wurden in den Diagrammen mit Sternchen [*] gekennzeichnet.

4 Ergebnisse und Auswertung

4.1 Orale MAP-Exposition in BALB/c-Mäusen

4.1.1 MAP und die Induktion der Zytokin-Genexpression

Induktion proinflammatorischer Zytokine IL-1 β und TNF- α durch MAP

In der dieser Arbeit zugrundeliegenden Studie wurde die transkriptionelle Expression proinflammatorischer Zytokine mittels Real-Time-PCR bestimmt. Dafür wurde das Kolon von (A) 11 Mäusen mit früher MAP-Exposition, (B) 7 Mäusen mit später MAP-Exposition und (C) 10 BALB/c-Mäusen ohne MAP-Exposition als Kontrollgruppe verwendet.

Das Kologewebe dieser BALB/c-Mäuse wurde nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und für die weiteren Versuche bei -80°C gelagert. Wir wählten für die transkriptionelle Expression proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α , die laut Literatur in der Pathogenese der Paratuberkulose und bei der Kontrolle mykobakterieller Infektionen eine wichtige Rolle spielen (54,65,78,79). Die transkriptionelle Expressions-Bestimmung dieser proinflammatorischen Zytokine mittels Real-Time PCR lieferten folgende Ergebnisse:

Wie Abbildung 12 darstellt, lag die Expression von IL-1 β im Kolon von früh (d3 = 3 Tage) oral MAP-infizierten Mäusen 21-fach ($p= 0,001$) höher als bei später Exposition (d21 = 21 Tage), bei der die Expression 4,3-fach ($p= 0,008$) gegenüber den Kontrollen erhöht war. Die Ergebnisse der TNF- α Expression unterschieden sich signifikant hinsichtlich einer frühen und einer späten Exposition. Die im frühen Alter MAP-exponierten Tiere zeigten eine 30-fach signifikant ($p<0,001$) höhere transkriptionelle Expression als die spät MAP-exponierten Gruppen (2-fach, $p= 0,011$).

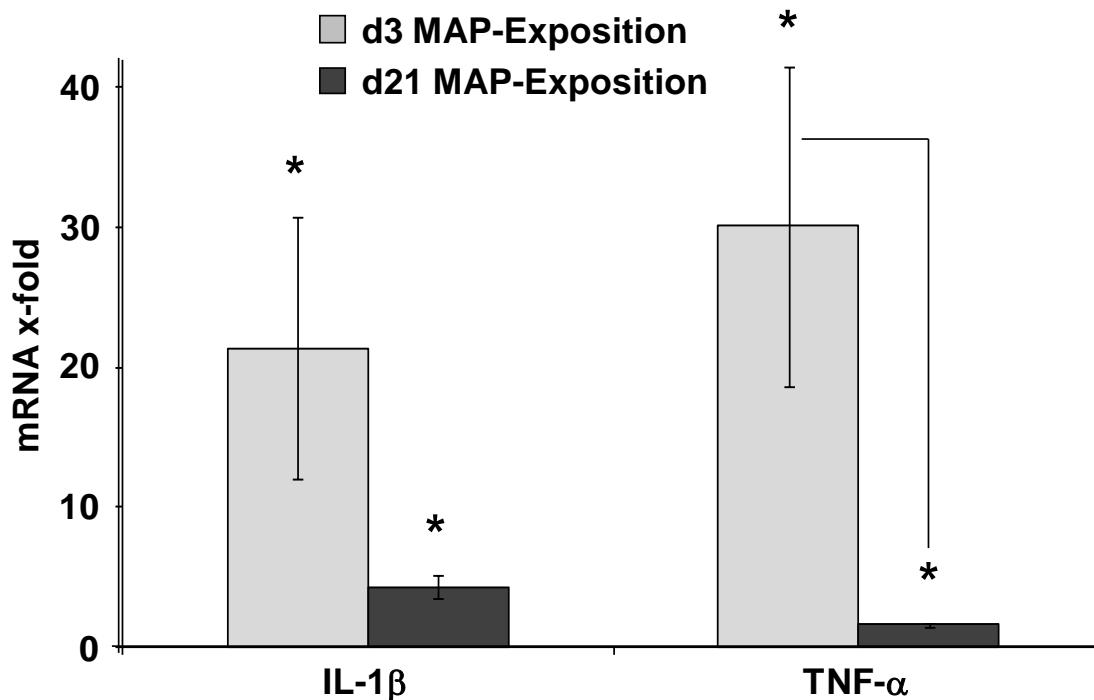


Abbildung 12: Expression von IL-1 β und TNF- α nach MAP-Exposition

IL-1 β und TNF- α wurden durch eine frühe MAP Gabe (Exposition nach 3d) induziert, IL- β hingegen war bei später MAP-Exposition (Exposition nach 21d) leicht induziert. Ein signifikanter Anstieg zwischen TNF- α nach früher und später MAP-Exposition wurde beobachtet. Die Mäuse aller Gruppen wurden voneinander getrennt analysiert (Kontrolle: n = 10, frühe MAP-Exposition: n = 11, späte MAP-Exposition: n = 7). Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mit * markiert. (d3 = 3 Tage; d21 = 21 Tage)

4.1.2 Quantifizierung der MMP Genexpression durch RT-PCR

Expression von MMPs im Kolon von BALB/c-Mäusen mit MAP-Exposition

Eine erhöhte Expression verschiedener MMPs in entzündeter Darmschleimhaut im Vergleich zur normalen Darmschleimhaut wurde in der Literatur beschrieben (179). Eine erhöhte Expression der MMPs kann möglicherweise zu einer chronischen Entzündung in der Darmschleimhaut führen. Bei CED und in verschiedenen Tiermodellen der Colitis konnte eine vermehrte Expression von MMPs wie MMP-1, -2, -3, -8, -9, -12, -14 beobachtet werden (179-183). Speziell in unseren Untersuchungen wurde die Expression bestimmter MMPs (MMP-2, -9, -7, -13, TIMP-1) aufgrund vorheriger Untersuchungen und Literaturrecherchen in Bezug auf MAP ausgewählt und im Darm von Mäusen mit früher und später MAP-Exposition sowie aus nicht-behandelten Kontrollen mittels RT-PCR quantifiziert.

Die Kolon-Gewebe von Mäusen, die sehr früh und eher spät MAP ausgesetzt waren, zeigten eine höhere Expression von MMP-2 (4,1-fach, $p = 0,024$ und 4,1-fachen,

p= 0,011, jeweils) und TIMP-1 (2,1-fache, p= 0,049 und 2,9-fach, p= 0,011) im Vergleich zu den Kontrolltieren. MMP-9 war lediglich nach einer frühen Exposition mit MAP 5,7-fach (p= 0,014) signifikant hochreguliert, während MMP-13 2,6-fach (p= 0,008) und MMP-14 3,8-fach (p= 0,005) nur nach einer späteren Exposition signifikant erhöht waren (Abb.13). Das Expressionslevel der MMPs und des TIMP-1 war - unabhängig von früher oder später MAP-Exposition - nahezu gleich stark erhöht.

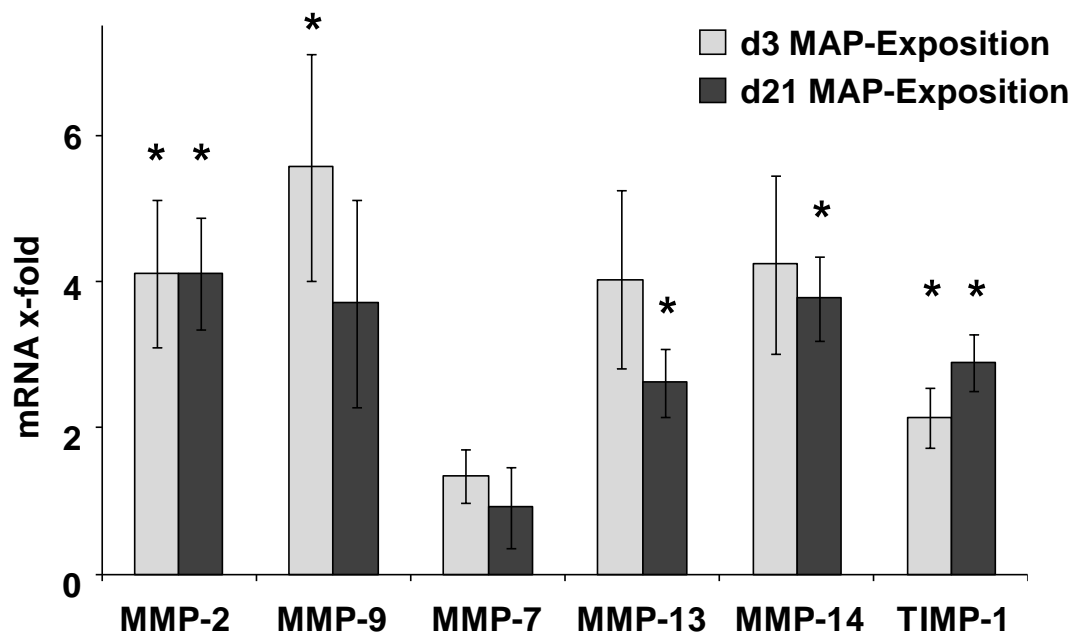


Abbildung 13: Expression von MMPs und TIMP-1 nach früher und später MAP-Exposition

MMP-2 und TIMP-1 waren signifikant erhöht im Kolon von Mäusen mit einer MAP-Exposition im Vergleich zu Kontroll-Mäusen. Die MMP-9 Expression war signifikant erhöht in Mäusen mit einer frühen Exposition mit MAP, aber nicht signifikant bei Mäusen mit einer späten MAP-Exposition. Die Expression von MMP-7 blieb unverändert nach MAP-Exposition. Bei der Genexpression von MMP-13 und MMP-14 war ein Anstieg nach später MAP-Exposition zu beobachten. Die Mäuse aller Gruppen wurden voneinander getrennt analysiert (Kontrolle: n = 10, frühe MAP-Exposition: n = 11, späte MAP-Exposition: n = 7). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mit * markiert. (d3 = 3 Tage; d21 = 21 Tage)

Die Regulation der Transkription von MMPs erfolgt durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone, die auf Genebene agieren. Jedoch reagieren nicht alle MMPs gleich auf denselben Reiz, weshalb die Regulation von der jeweiligen MMP abhängig ist (150,171). Unsere Untersuchungen konnten aufzeigen, dass die transkriptionelle IL-1 β -Expression positiv mit der MMP-2- ($r = 0,466$, $p = 0,038$), MMP-9- ($r = 0,513$, $p = 0,020$), MMP-14- ($r = 0,553$, $p = 0,011$), TIMP-1- ($r = 0,505$, $p = 0,023$), TLR-2- ($r = 0,672$, $p = 0,002$) und TLR-6-Expression ($r = 0,630$, $p = 0,004$) korreliert. Die Expression von TNF-

α hingegen korrelierte nur mit der TLR-2- ($r = 0,754$, $p < 0,001$) und TLR-6-Expression ($r = 0,621$, $p = 0,004$). Basierend auf Korrelationskoeffizienten $> 0,6$ ergab sowohl IL-1 β als auch TNF- α eine relevante Korrelation mit der TLR-2 und TLR-6 Expression.

Da vorherige Untersuchungen darauf hindeuten, dass MMP-2 und MMP-9 von besonderer Relevanz für die Pathogenese von mykobakteriellen Infektionen sind (142,225,226), wurde die Proteinaktivität dieser Gelatinasen mittels Zymographie analysiert (Abb.14). Analog zur transkriptionellen Regulation waren sowohl die MMP-2 als auch die MMP-9-Aktivität in MAP-infizierten Mäusen im Vergleich zu der Kontrollgruppe erhöht. Die höchste Gelatinaseaktivität konnte bei Mäusen mit MAP-Exposition an Tag 3 nach der Geburt beobachtet werden.

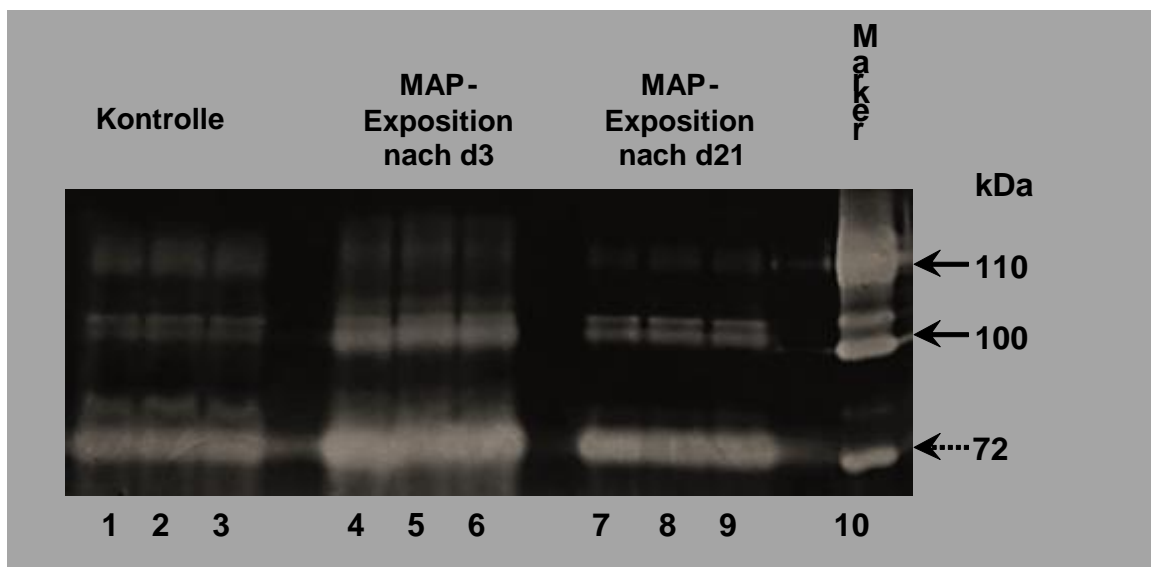


Abbildung 14: Gelatine Zymographie zur Darstellung der MMP-9 Aktivität

Die Gelatine-Zymographie aus murinem Darmgewebe weist eine erhöhte MMP-9-Aktivität bei Gabe von MAP direkt nach der Geburt (d3 MAP) auf (Banden 4-6). Schwarzer Pfeil: proMMP-9 110 kDa, grauer Pfeil: 100 kDa aktive MMP-9. Abgesehen von MMP-9 wurde auch MMP-2 durch eine MAP-Exposition induziert: MMP-2 72 kDa (gestrichelter Pfeil). Die gleiche Menge an Gewebelysaten wurde von jeder Gruppe gepoolt und drei Mal für jede Gruppe geladen. (d3 = 3 Tage; d21 = 21 Tage)

4.1.3 Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren durch orale Exposition mit MAP

MAP-Exposition verstärkt die transkriptionelle Expression von TLR-2 und TLR-6 im Dickdarm von BALB/c-Mäusen

TLR-2 und TLR-6 spielen eine wesentliche Rolle bei der angeborenen Immunantwort gegen Mykobakterien (34,114,140,227-229), weshalb die Expression speziell dieser TLRs in MAP ausgesetzten Mäusen und Kontrollen mittels RT-PCR quantifiziert wurde. Abbildung 15 zeigt, dass sowohl TLR-2 (23-fach, $p = 0,001$) als auch TLR-6 (8,0-fach, $p = 0,036$) eine erhöhte Gen-Expression bei Mäusen, die am Tag 3 MAP ausgesetzt wurden, aufweisen. Die Expression von TLR-2 wurde auch bei Mäusen durch die orale Gabe von MAP am Tag 21 9,5-fach ($p = 0,005$) signifikant gesteigert. Das Expressionslevel von TLR-6 hingegen war bei einer späten Exposition mit MAP unverändert im Vergleich zu den Kontrolltieren.

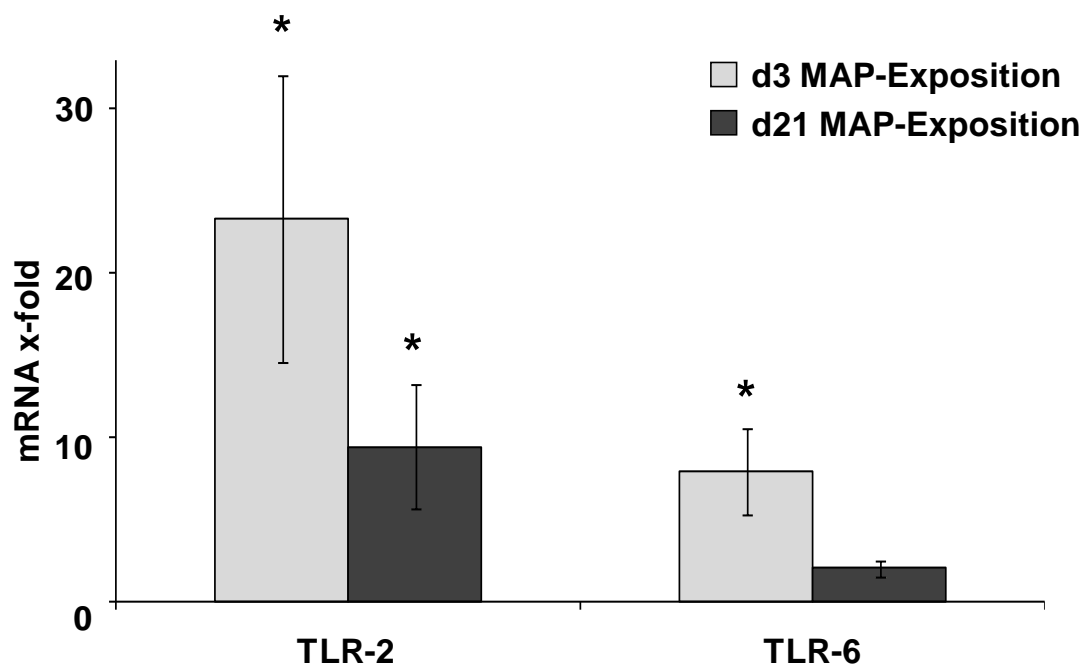


Abbildung 15: Genexpression von TLRs nach MAP-Exposition

Die TLR-2 Expression auf mRNA Ebene wurde durch frühe und späte Exposition mit MAP hochreguliert, wohingegen eine erhöhte TLR-6 Expression nur bei einer frühen MAP-Exposition im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachten ist. Die Mäuse aller Gruppen wurden voneinander getrennt analysiert (Kontrolle: $n = 10$, frühe MAP-Exposition: $n = 11$, späte MAP-Exposition: $n = 7$). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mit * markiert. (d3 = 3 Tage; d21 = 21 Tage)

Durch die Immunhistologie konnte eine verstärkte TLR-2-Expression auf der luminalen Seite der Enterozyten im Kolon festgestellt werden. Hinsichtlich der TLR-2-Transkription ergab sich eine positive Korrelation mit dem mRNA-Spiegel von MMP-2 ($r = 0,383$, $p = 0,049$), MMP-9 ($r = 0,404$, $p = 0,037$), MMP-14 ($r = 0,393$, $p = 0,043$) und TIMP-1 ($r = 0,403$, $p = 0,037$), während die TLR-6-Expression mit TIMP-1 ($r = 0,394$, $p = 0,042$) korreliert. Betrachtet man jedoch nur Korrelationskoeffizienten über 0,6 (d.h. $r^2 > 0,36$), war keine überzeugende Korrelation zwischen MMPs und TLRs zu beobachten (Abb.16).

Tabelle 8 zeigt zusammengefasst in einer Übersicht alle zu dem Versuch gemessenen n-fachen Expressionssteigerungen.

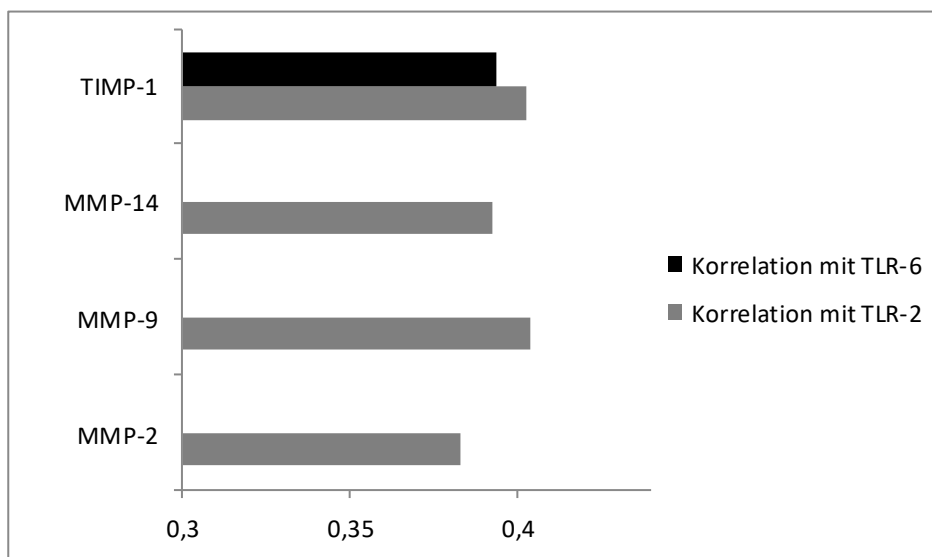


Abbildung 16: Balkengrafik der Korrelationskoeffizienten

TLR-2-Transkription ergab eine positive Korrelation mit MMP-2 ($p = 0,049$), MMP-9 ($p = 0,037$), MMP-14 ($p = 0,043$) und TIMP-1 ($p = 0,037$), während TLR-6 nur mit TIMP-1 ($p = 0,042$) korreliert.

Tabelle 8: Übersicht zur Genexpression der Zytokine und MMPs nach MAP-Exposition.

Die Signifikanzen wurden immer im Vergleich zur Kontrollgruppe berechnet. p= Signifikanzen, ø = keine Signifikanz (n-fach erhöht)

| | TNF- α | IL-1 β | MMP-2 | MMP-7 | MMP-9 | MMP-13 | MMP-14 | TIMP-1 |
|--------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Frühe MAP-Exposition d3 | 30-fach, $p < 0,001$ | 21-fach, $p = 0,001$ | 4,1-fach, $p = 0,024$ | ø | 5,7-fach, $p = 0,014$ | ø | ø | 2,1-fach, $p = 0,049$ |
| Späte MAP-Exposition d21 | 2-fach, $p = 0,011$ | 4,3-fach, $p = 0,008$ | 4,1-fach, $p = 0,011$ | ø | ø | 2,6-fach, $p = 0,008$ | 3,8-fach, $p = 0,005$ | 2,9-fach, $p = 0,011$ |

4.1.4 Histologische und immunhistologische Ergebnisse

Histopathologische Beurteilung von murinem Kolon in BALB/c-Mäusen mit MAP-Exposition und Kontrollgruppen

In folgenden Untersuchungen konnte eine immunhistochemische MAP-Kolonisierung zusätzlich durch die Ziehl-Neelsen-Färbung bestätigt werden. Die Ziehl Nielsen Färbung ist in der Lage Mykobakterien im murinen Kolon bei oral MAP ausgesetzten Tieren (Abb.17) zu detektieren.

Die Lokalisation von MAP und Sphäroplasten in CD45⁺ Leukozyten-Aggregaten bei früh oral mit MAP infizierten Mäusen (Abb.18) wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen dargestellt. Wie Abbildung 19 zeigt, konnte dies nicht in Kontrollmäusen beobachtet werden. Klinische Befunde wie Änderungen des Körpergewichts, blutiger Durchfall oder andere histologische Veränderungen, die charakteristisch für eine IBD sind, z. B. Granulome, Ulzerationen oder architektonische Veränderungen an den Krypten in Mäusen mit einer MAP-Exposition, wurden nicht beobachtet.

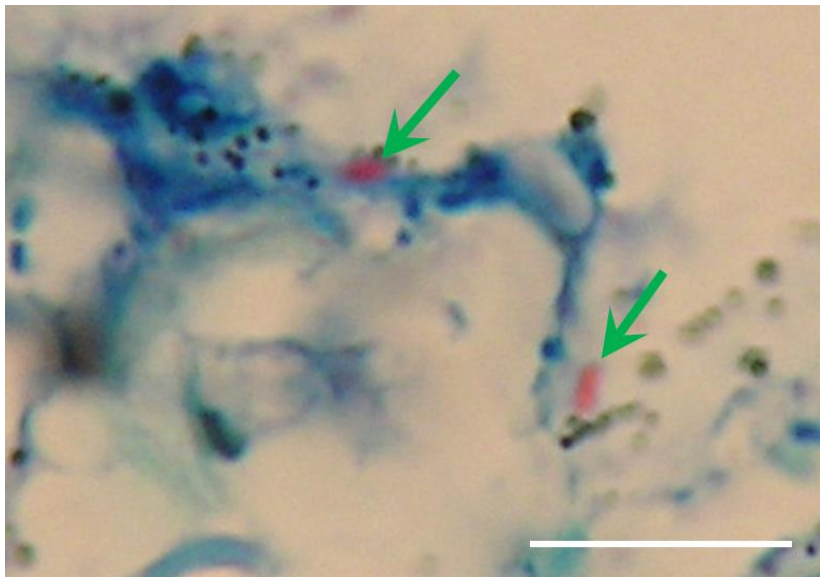


Abbildung 17: Ziehl-Neelsen-Färbung

Ziehl-Neelsen-Färbung im murinem Kolon von MAP infizierten Tieren. Kolonbiopsie bei früher MAP-Exposition. Original Vergrößerung x1000, grüne Pfeile zeigen Ziel-Neelsen gefärbte Mykobakterien. Maßstab 10 µm.

MAP(grün)/CD45(rot)

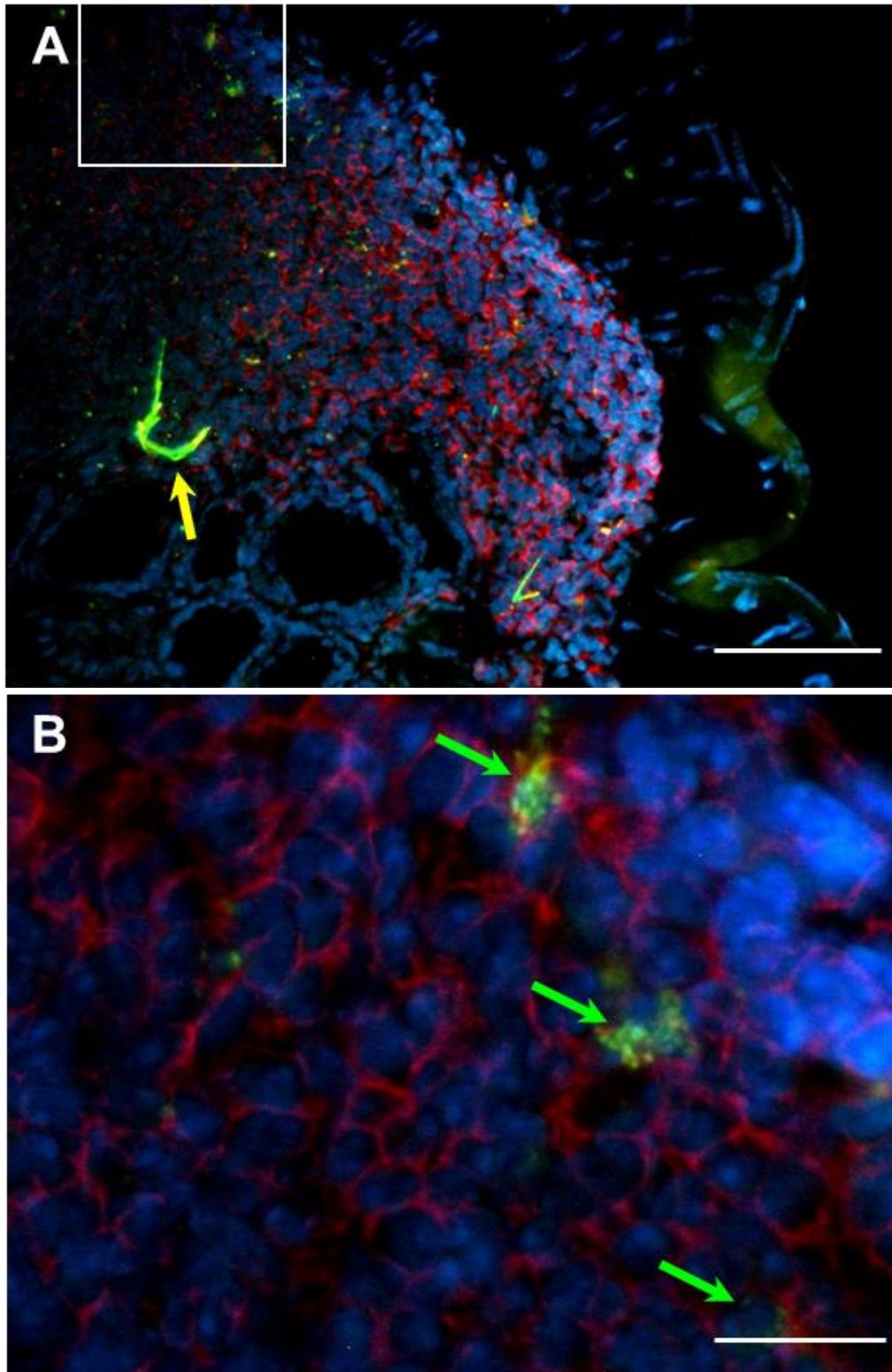


Abbildung 18: Immunfluoreszenzfarbungen von MAP/CD45 im Kolon mit MAP-Exposition

(A-B) Co-Immunfluoreszenzfarbungen von MAP (Grün) und PAN-Leukozyten-Marker CD45 (rot). Grüne Pfeile stellen Kolonien von MAP-Bakterien, in Sphäroplasten-Form, in Leukozyten dar. Gelbe Pfeile zeigen Artefakte. (B) repräsentiert eine Vergrößerung aus (A) wie gekennzeichnet. Original-Vergrößerung x200 (A) und x1000 (B), Maßstabs-Balken 100 mm (x200) und 20 mm (x1000), Blau-Färbung in allen Proben: DAPI.

MAP(grün)/CD45(rot)

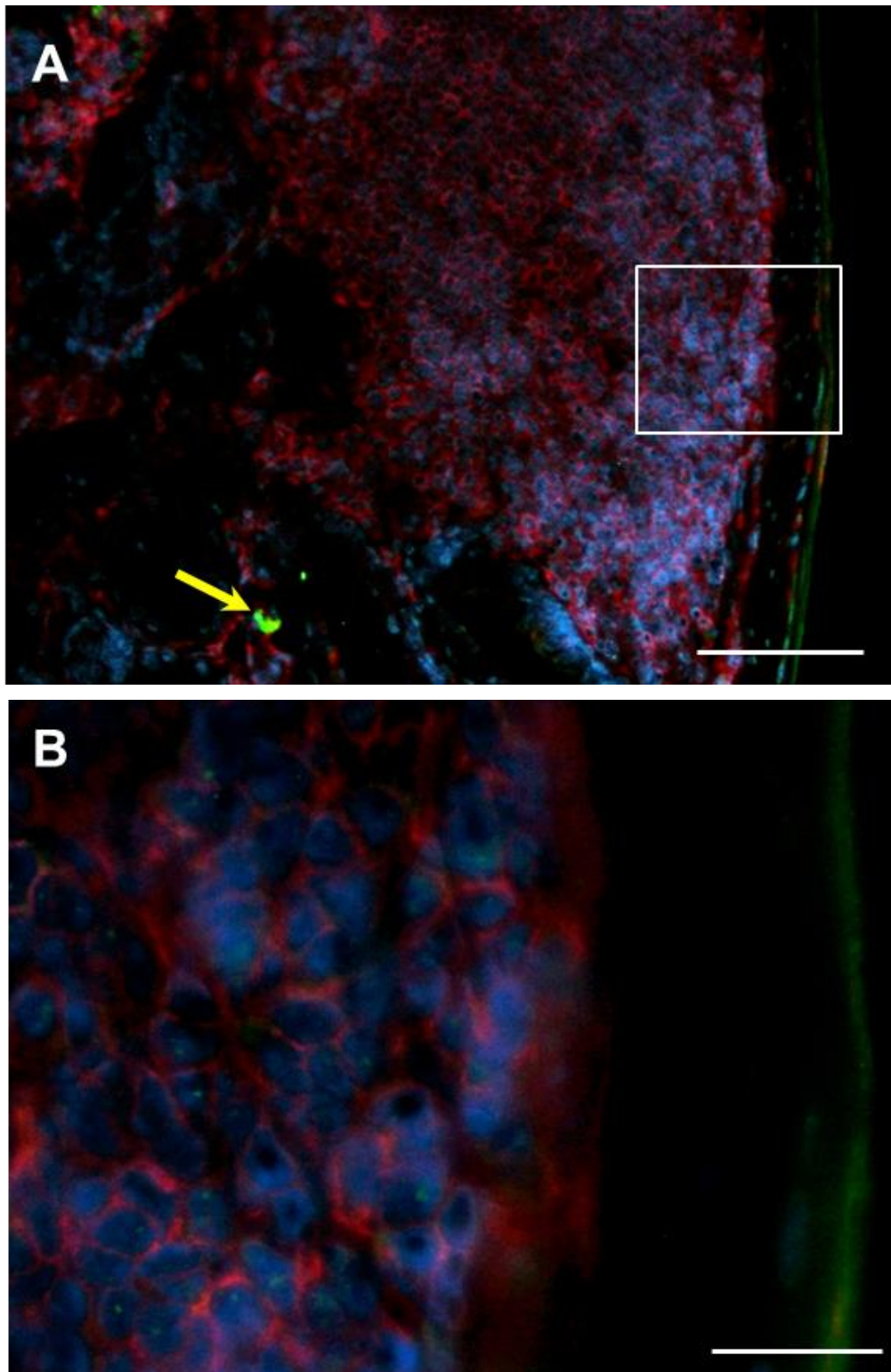


Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbungen von MAP/CD45 im murinen Kolon (Kontrolle)

(A-B) Co-Immunfluoreszenzfärbungen von MAP (Grün) und PAN-Leukozyten-Marker CD45 (rot). Gelbe Pfeile zeigen Artefakte. (B) ist eine Vergrößerung aus (A), wie gekennzeichnet. Original-Vergrößerung x200 (C) und x1000 (D), Maßstabs-Balken 100 mm (x200) und 20 mm (x1000), Blau-Färbung in allen Proben: DAPI.

Immunhistologischer Nachweis von CD45⁺-Leukozyten und MMP-9-Expression im murinen Kolon von BALB/c-Mäusen

Um den zellulären Ursprung der verstärkten MMP-9-Expression aus der qRT-PCR und der Zymographie zu bestimmen, wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. In dieser Arbeit wurden CD45⁺-Leukozyten als eine wichtige zelluläre Quelle der erhöhten MMP-9 Expression in MAP-infizierten Mäusen identifiziert, was die Abbildungen 20 und 21 veranschaulichen. Darüber hinaus führte das Zählen der absoluten Zahl der CD45⁺/MMP-9⁺-Zellen zu der Erkenntnis, dass während der Stillperiode die mit MAP infizierten Mäuse eine signifikant höhere Anzahl von CD45⁺/MMP-9⁺-Zellen in der Lamina propria der Mukosa hatten, als nicht-infizierte Kontrollen (Abb.22).

Zelluläre Lokalisation von MMP-9 und TLR-2 nach oraler MAP Gabe im murinen Kolon von BALB/c-Mäusen

Die RT-PCR-Ergebnisse lieferten einen signifikanten Anstieg der TLR-2-Expression sowohl bei früher als auch bei später MAP-Exposition, der auch mittels Immunhistochemie bestätigt werden konnte. Co-Immunfluoreszenzfärbungen zeigten eine verstärkte MMP-9-Expression in bereits während der Stillperiode MAP ausgesetzten Tieren. Des Weiteren lassen die Färbungen auf eine enge Beziehung zwischen luminaler TLR-2-Expression in Enterozyten und Clustern von MMP-9-exprimierenden Leukozyten in der Lamina propria der Mukosa schließen (Abb.20 und 21). Interessanterweise konnten mukosale Lyphozyten-Aggregate in der unmittelbaren Nähe der MMP-9-exprimierenden Cluster nachgewiesen werden (Abb.21 B).

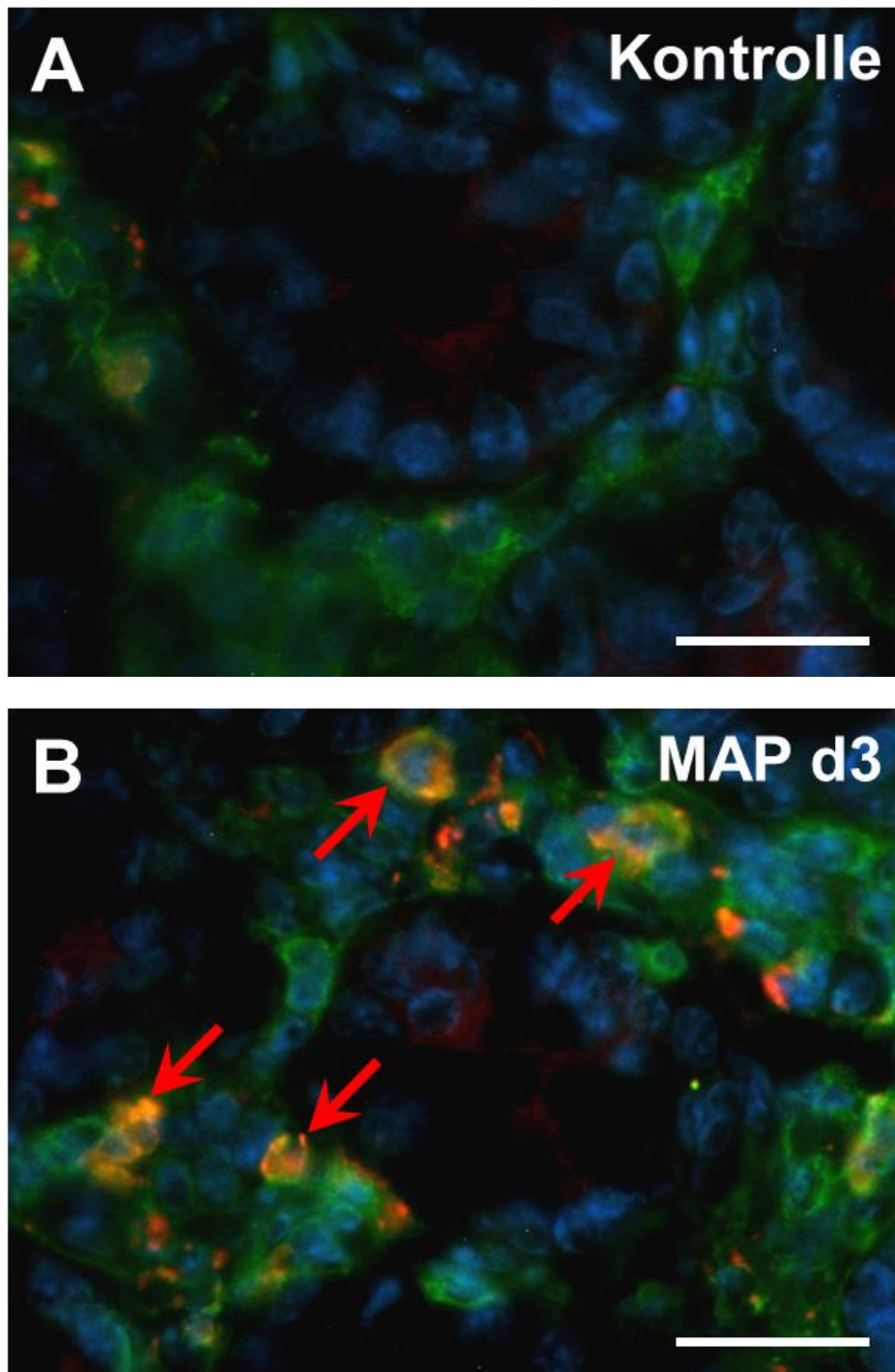


Abbildung 20: Zelluläre Lokalisation von MMP-9 in MAP-exponierten Mäusen
 (A) und (B) Co-Immunfluoreszenzfärbung für PAN-Leukozyten-Marker CD45 (grün) und MMP-9 (rot). Rote Pfeile zeigen MMP-9-exprimierende Leukozyten. Original-Vergrößerung x1000, Maßstab 25 µm, Blau-Färbung: DAPI. (d3 = 3 Tage)

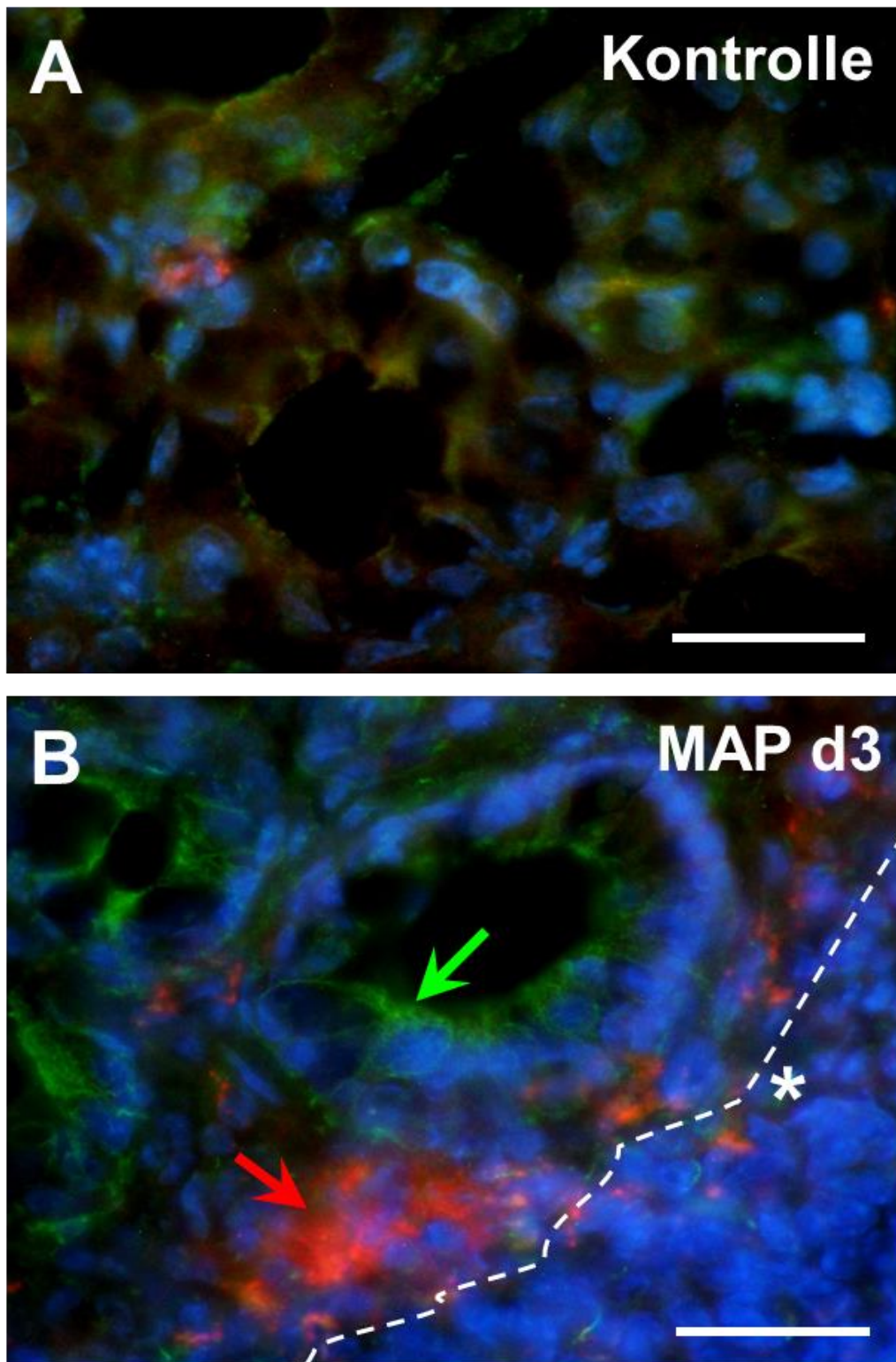


Abbildung 21: Zelluläre Lokalisation von TLR-2 in MAP-exponierten Mäusen.
 (A) und (B) Co-Immunfluoreszenzfärbung für TLR-2 (grün) und MMP-9 (rot). Grüner Pfeil: verstärkte apikale TLR-2-Expression in Kolon-Enterozyten, roter Pfeil: Cluster von MMP-9-exprimierenden Zellen neben einem mukosalen Lymphozyten Aggregat (*). Original-Vergrößerung x1000, Maßstab 25 µm, Blau-Färbung: DAPI. (d3 = 3 Tage)

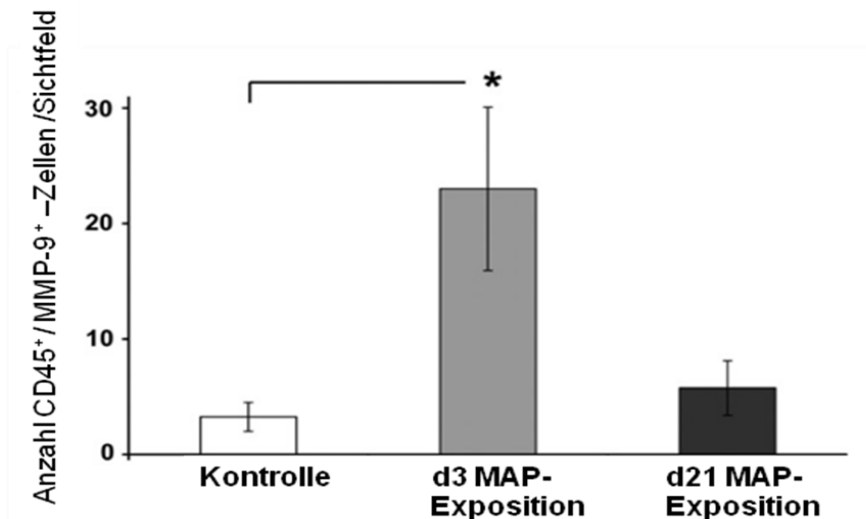


Abbildung 22: CD45+/MMP-9+ Zellzahl im Dickdarm.

Die Anzahl der CD45+/MMP-9+ Zellen im Dickdarm von MAP-exponierten Mäusen und Kontrollen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SD dargestellt. Die Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mit * markiert. (d3 = 3 Tage; d21 = 21 Tage)

4.2 Intraperitoneale MAP-Infektion in T-Zell-rekonstituierten BL/6-Mäusen

4.2.1 Zytokin-Genexpression nach intraperitonealer MAP-Infektion

Entzündungsreaktion nach MAP-Infektion und CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zell-Rekonstitution

Für die transkriptionelle Expression wählten wir proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 β und TNF- α , die laut der Literatur in der Pathogenese der Paratuberkulose und bei der Kontrolle mykobakterieller Infektionen eine wichtige Rolle spielen (54,65,78,79). Eine erhöhte Produktion von IL-1 β und TNF- α wurde in der Schleimhaut mikroskopisch normaler CD-Patienten beobachtet (84,85).

In Übereinstimmung mit unserer Hypothese war die Genexpression von TNF- α in MAP-infizierten und CD4⁺CD45RB^{lo/int} rekonstituierten Rag2^{-/-}-Mäusen 4,9-fach ($p = 0,049$) signifikant erhöht, aber nicht in Mäusen mit einer MAP-Infektion ohne gleichzeitige T-Zell-Rekonstitution oder solchen, die nur mit CD4⁺CD45RB^{lo/int} rekonstituiert wurden.

Die IL-1 β -Genexpression war ebenfalls tendenziell erhöht, erreichte aber nicht das Niveau der statistischen Signifikanz (Abb.23). Die Zytokin-Genexpression zeigte weder in CD4⁺CD45RB^{hi} rekonstituierten und gleichzeitig MAP-infizierten Mäusen noch nach einer Rekonstitution mit CD8⁺ T Zellen signifikanten Veränderungen.

Nachdem ein Anstieg der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β in Gegenwart von MAP und CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zellen zu beobachten war, wurde das Augenmerk auf jene Faktoren gelegt, die für die Aufrechterhaltung der Entzündung und die Gewebeerstörung verantwortlich waren, also auf die MMP-Spiegel sowie ihre inhibitorischen Regulatoren, die TIMPs (152,157).

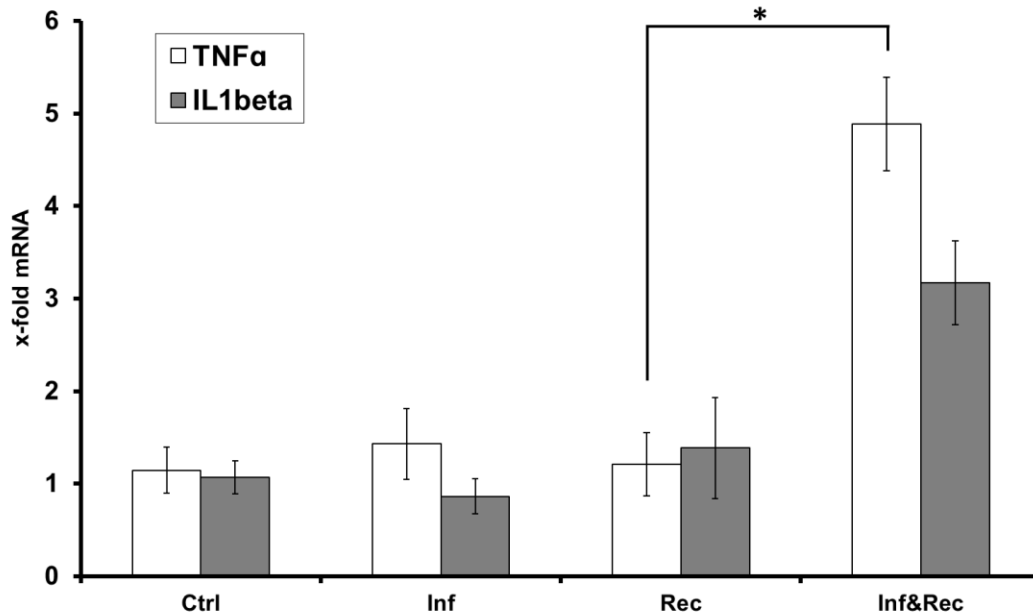


Abbildung 23: TNF- α - und IL-1 β -Expression.

Die Mäuse wurden i.p. mit 10^8 CFU MAP infiziert und nach 4 Wochen mit CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zellen rekonstituiert. Rekonstituierte und MAP-infizierte Mäuse wurden mit nur rekonstituierten Mäusen verglichen. Keine Unterschiede bezüglich der Expression wurden in Proben ohne T-Zell-Rekonstitution gefunden (Daten nicht gezeigt). Ctrl = Rag2^{-/-}-Mäuse mit PBS behandelt; Inf = Rag2^{-/-}-Mäuse i.p. mit MAP infiziert; Rec = Rag2^{-/-}-Mäuse mit CD4⁺CD45RB^{lo/int} rekonstituiert; Inf&Rec = Rag2^{-/-}-Mäuse i.p. mit MAP infiziert und mit CD4⁺CD45RB^{lo/int} rekonstituiert. n = 4. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mit *markiert.

4.2.2 Einfluss einer MAP-Infektion auf die MMP-Genexpression

Effekt einer MAP-Infektion auf die Expression von MMPs in murinem Kolon

Die Genexpression von MMPs wurde mittels qRT-PCR in Rag2^{-/-}-Mäusen nach einer Rekonstitution mit verschiedenen T-Zellen gemessen. Bei den Messungen wurde 18S rRNA als Housekeeping-Gen genutzt. Eine erhöhte Expression der MMPs könnte laut Literatur zu einer chronischen Entzündung in der Darmschleimhaut führen. Speziell für unsere Untersuchungen wurde die Expression folgender Gene im Kolon gemessen: MMP-2, -7, -9, -13, und -14, TIMP-1 und TIMP-2. Ein signifikant erhöhtes Expressionslevel wurde bei MMP-9 (4-fach, p= 0,043), MMP-13 (4,5-fach, p= 0,021) und TIMP-1 (3-fach, p= 0,021) nach 56 Tagen MAP-Infektion und CD4⁺CD45RB^{lo/int} Rekonstitution im Vergleich zu den nur CD4⁺CD45RB^{lo/int}-rekonstituierten, nicht MAP-infizierten Rag2^{-/-}-Mäusen beobachtet (Abb.24 A).

Im Darm von MAP-infizierten Rag2^{-/-}-Mäusen mit einer CD4⁺CD45RB^{hi} Rekonstitution wurde eine erhöhte Expression von MMP-9 (2,4-fach, p= 0,021) und TIMP-1 (4,2-fach, p= 0,021) im Vergleich zu nicht infizierten T-Zell-rekonstituierten Rag2^{-/-}-Mäusen (Abb.24 B) festgestellt. Ähnlich wie bei den Ergebnissen für TNF-α blieben diese Marker in ihrer Expression in Rag2^{-/-}-Mäuse, die nur mit MAP infiziert oder nur mit T-Zellen rekonstituiert wurden, unverändert. Auch hier zeigte eine Rekonstitution mit CD8⁺ T-Zellen keinen Effekt auf die MMP- und TIMP-Expression.

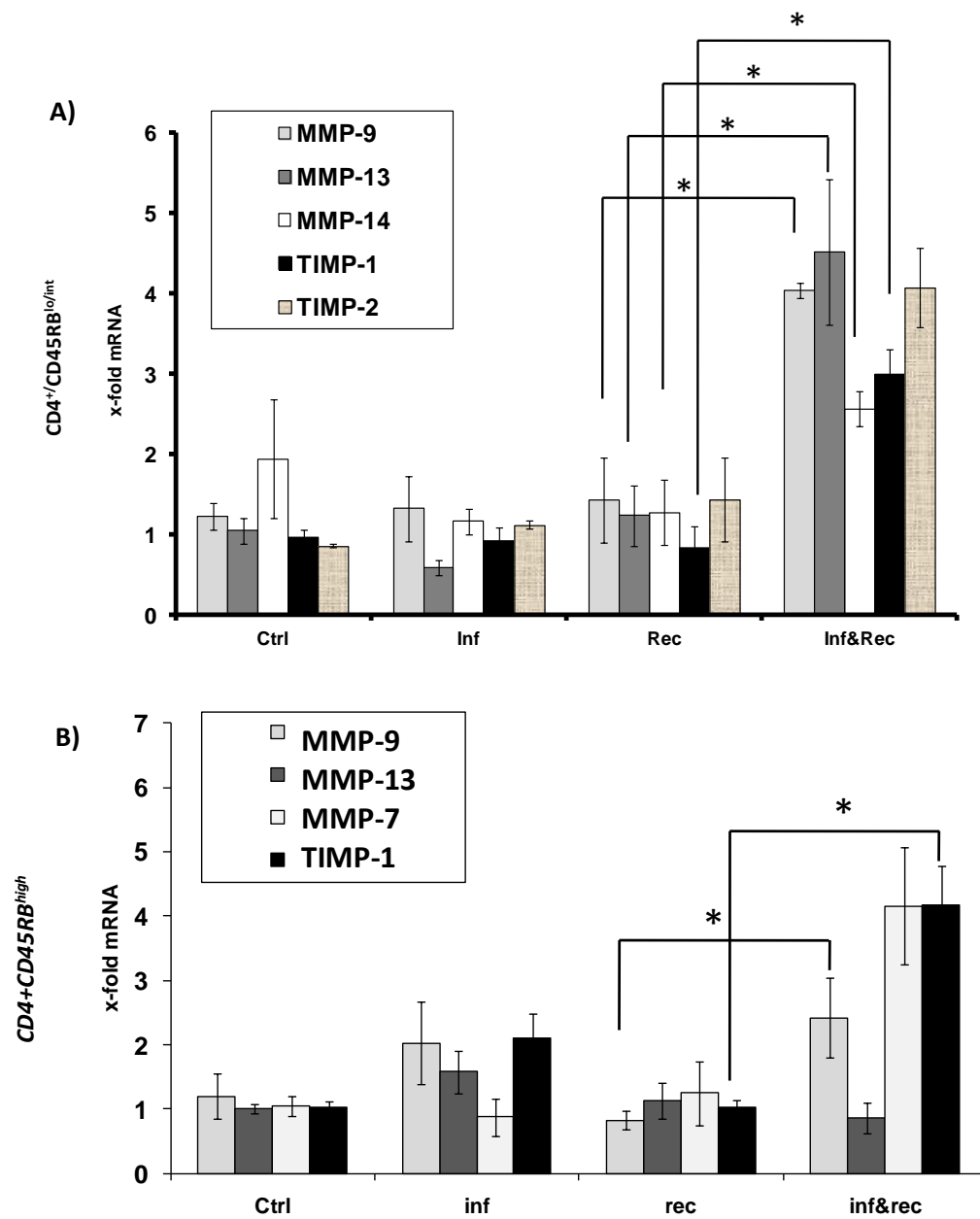


Abbildung 24: MMP-Genexpression.

A) Die Mäuse wurden i.p. mit MAP infiziert und nach 4 Wochen mit CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zellen rekonstituiert. **B)** Die Mäuse wurden i.p. mit MAP infiziert und nach 4 Wochen mit CD4⁺CD45RB^{hi} T-Zellen rekonstituiert. Rekonstituierte und MAP-infizierte Mäuse wurden mit nur rekonstituierten verglichen. Keine Unterschiede bezüglich der Expression in Proben ohne T-Zell-Rekonstitution (Daten nicht gezeigt). Ctrl = Rag2^{-/-}-Mäuse mit PBS behandelt; Inf = Rag2^{-/-}-Mäuse i.p. mit MAP infiziert; Rec = Rag2^{-/-}-Mäuse rekonstituiert; Inf&Rec = Rag2^{-/-}-Mäuse i.p. mit MAP infiziert und rekonstituiert. n = 4. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SEM dargestellt. Die Signifikanz (p < 0,05) wurde mit * markiert.

4.2.3 Toll-like-Rezeptor-Genexpression bei MAP-Infektion

Transkriptionelle Expression von TLR nach MAP-Infektion und T-Zell-Rekonstitution

TLRs spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung von MAP und sind an der Einleitung der Immunantwort durch eine bakterielle Infektion beteiligt. Aus diesem Grund wurde die Expression von TLRs, die bei der Erkennung von mykobakteriellen Komponenten beteiligt sind, quantifiziert. Im Einklang mit seiner prominenten Rolle für die Erkennung von MAP (216,230,231), konnte eine 2,2-fach ($p = 0,043$) signifikant erhöhte Expression von TLR-6 im Kolon von $CD4^+CD45RB^{lo/int}$ rekonstituierten und gleichzeitig MAP-infizierten Mäusen im Vergleich zu rekonstituierten Mäusen ohne MAP-Infektion oder nur MAP-infizierten Mäusen (Abb. 25) beobachtet werden. Ebenso zeigten TLR-2, -3 und -9 tendenziell höhere Expressionen in Mäusen mit einer MAP-Infektion und $CD4^+CD45RB^{lo/int}$ Rekonstitution, die aber nicht das Niveau der statistischen Signifikanz erreichten.

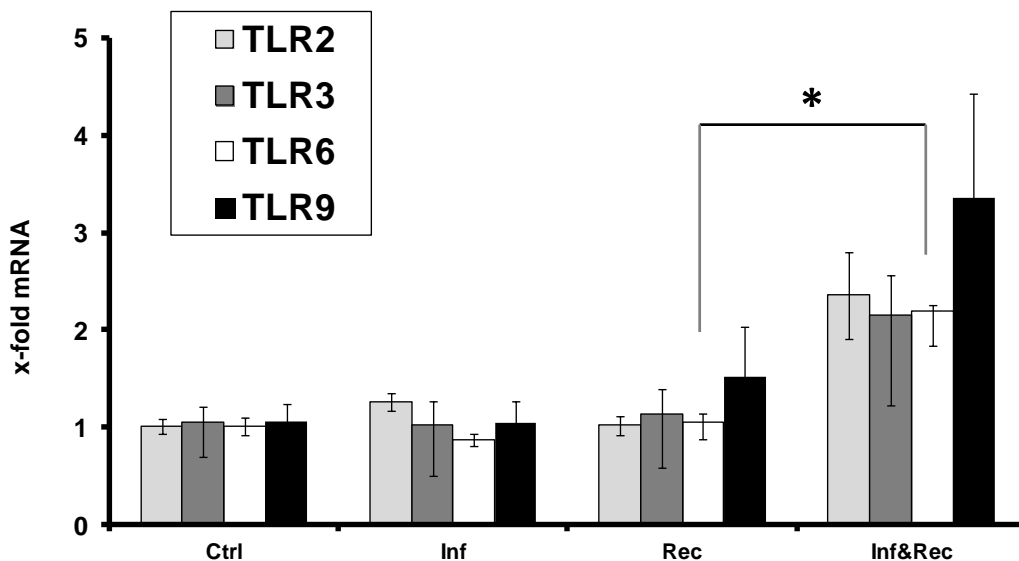


Abbildung 25: TLR Expression mittels RT-PCR.

Die Mäuse wurden i.p. mit 10^8 CFU MAP infiziert und nach 4 Wochen mit $CD4^+CD45RB^{lo/int}$ T-Zellen rekonstituiert. Rekonstituierte und MAP-infizierte Mäuse wurden mit nur rekonstituierten Mäusen verglichen. Keine Unterschiede bezüglich der Expression wurden in Proben ohne T-Zell-Rekonstitution gefunden (Daten nicht gezeigt). Ctrl = $Rag2^{-/-}$ -Mäuse mit PBS behandelt; Inf = $Rag2^{-/-}$ -Mäuse i.p. mit MAP infiziert; Rec = $Rag2^{-/-}$ -Mäuse mit $CD4^+CD45RB^{lo/int}$ rekonstituiert; Inf&Rec = $Rag2^{-/-}$ -Mäuse i.p. mit MAP infiziert und mit $CD4^+CD45RB^{lo/int}$ rekonstituiert. $n = 4$. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mit * markiert.

Die Genexpressionen von TLRs in kombinierter CD4⁺CD45RB^{hi} Rekonstitution und MAP-Infektion oder CD8⁺ Rekonstitution und MAP-Infektion wiesen keine signifikanten Veränderungen auf.

Tabelle 9 zeigt in einer Übersicht alle zu dem Versuch gemessenen n-fachen Expressionssteigerungen.

Tabelle 9: Übersicht zur Genexpression der Zytokine und MMPs nach intraperitonealer MAP-Infektion.

Die aufgezeigten Signifikanzen wurden im Vergleich zu nur rekonstituierten Tieren berechnet.

p=Signifikanzen, ø = keine Signifikanz

| | | TNF-α | IL-1β | MMP-9 | MMP-13 | MMP-14 | TIMP-1 | TIMP-2 |
|--|---------|----------------------|-------|----------------------|----------------------|--------|----------------------|--------|
| CD4 ⁺ CD45 ^{lo/int} RB | Inf&Rec | 4,9-fach, p=0,049 | ø | 4-fach, p=0,043 | 4,5-fach, p=0,021 | ø | 3-fach, p=0,021 | ø |
| CD4 ⁺ CD45 ^{high} B | Inf&Rec | ø | ø | 2,4-fach, p=0,021 | ø | ø | 4,2-fach, p=0,021 | ø |

4.2.4 Immunhistologische Ergebnisse

Immunhistochemie von MAP infizierten, CD4⁺CD45RB^{lo/int}-rekonstituierten Rag2^{-/-}-Mäusen

In der aktuellen Studie wurden MAP im Kolon von MAP-infizierten Rag2^{-/-}-Mäusen durch Immunfluoreszenzfärbungen mittels eines polyklonalen Antiserums gegen das Protein MAP 1775 (Abb. 26) identifiziert. Trotz einer i.p. Infektion konnten MAP als Stäbchen vereinzelt auch im Dickdarmgewebe aller 4 MAP-infizierten Mäusen (mit CD4⁺CD45RB^{lo/int} Rekonstitution) beobachtet werden.

Hinweise aus der Literatur deuten darauf hin, dass es während der Infektion innerhalb der Darmmukosa zur intrazellulären Proliferation der Bakterien in infizierten Makrophagen kommt (3,11,44-46).

Interessanterweise zeigten Immunfluoreszenzfärbungen in Abbildung 27 intrazelluläre Cluster von MAP, umgeben von Aggregaten aus CD45⁺-Leukozyten. Die Infiltration von CD45⁺-Leukozyten in MAP-infizierten und CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zellen rekonstituierten Mäusen wird nochmals vergrößert in Abbildung 28 und 29 dargestellt. Eine Immunfluoreszenzfärbung mit F4/80 (grün) und MMP-9 (rot) zeigt eine Akkumulation von Makrophagen neben MMP-9-positiven Zellen (Abb. 27). Ferner konnten Zellen, die MMP-9 exprimieren, in der Nähe oder direkt an Clustern von MAP (Abb. 30) nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse wurden ebenfalls bei MAP-infizierten Rag2^{-/-}-Mäusen mit einer CD4⁺CD45RB^{hi} T-Zell-Rekonstitution beobachtet: MAP in CD45⁺-Leukozyten und MMP-9 exprimierenden Zellen in unmittelbarer Nähe von Clustern der MAP (Abb. 31).

Inf&Rec

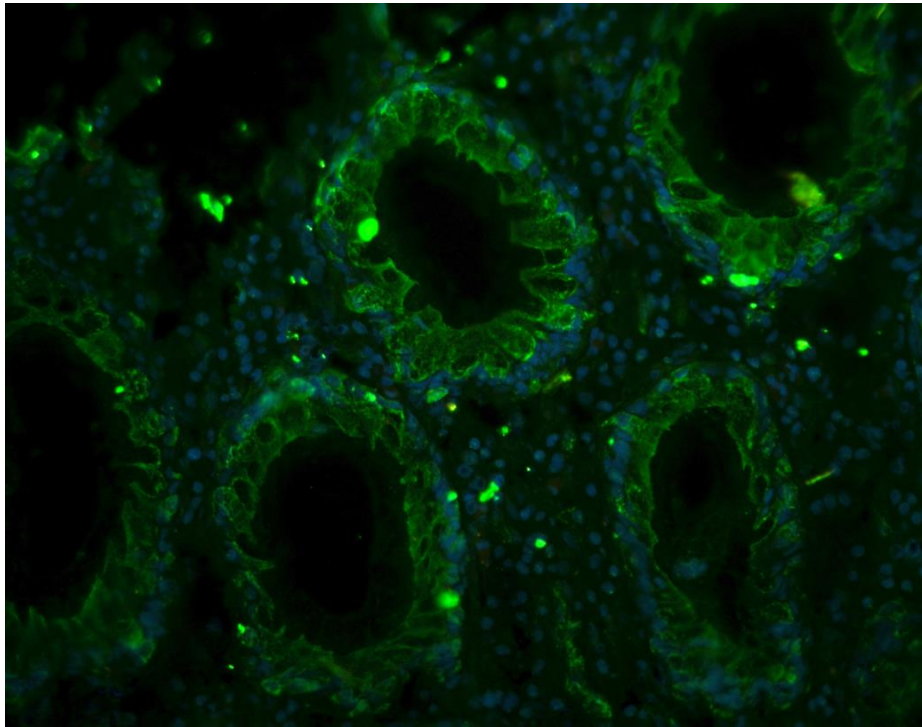


Abbildung 26: Immunhistochemische Lokalisation von MAP in Krypten des Darms

Von murinem Kolongewebe MAP-infizierter und CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zellen rekonstituierter Mäuse. Proben wurden mit polyklonalem Antiserum gegen MAP 1775 (grün) gefärbt. Deutlich zu erkennen ist die Erhaltung der Kriptenarchitektur des Darms. Blaufärbungen: DAPI

Inf&Rec

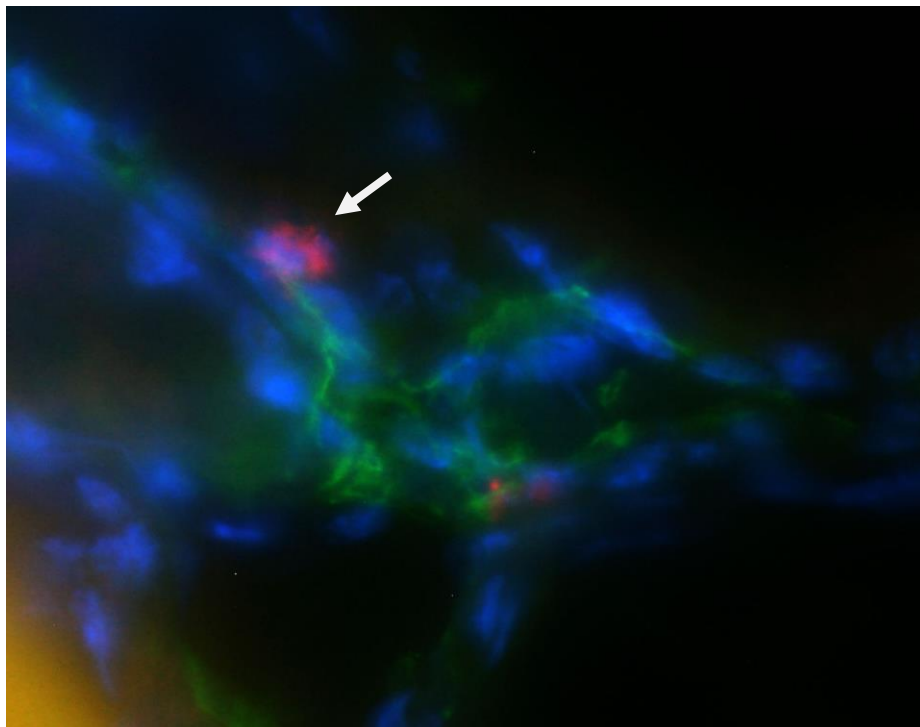


Abbildung 27: Zelluläre Lokalisation von F4/80 und MMP-9.

Von murinen Kolon MAP-infizierter und CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zellen rekonstituierter Mäuse. Proben wurden mit dem Makrophagen Marker F4/80 (grün) und MMP-9 (rot) gefärbt. Der weiße Pfeil zeigt auf eine MMP-9 exprimierende Zelle. Vergrößerungen ca. x1000. Blaufärbungen: DAPI

MAP(grün)/CD45(rot)

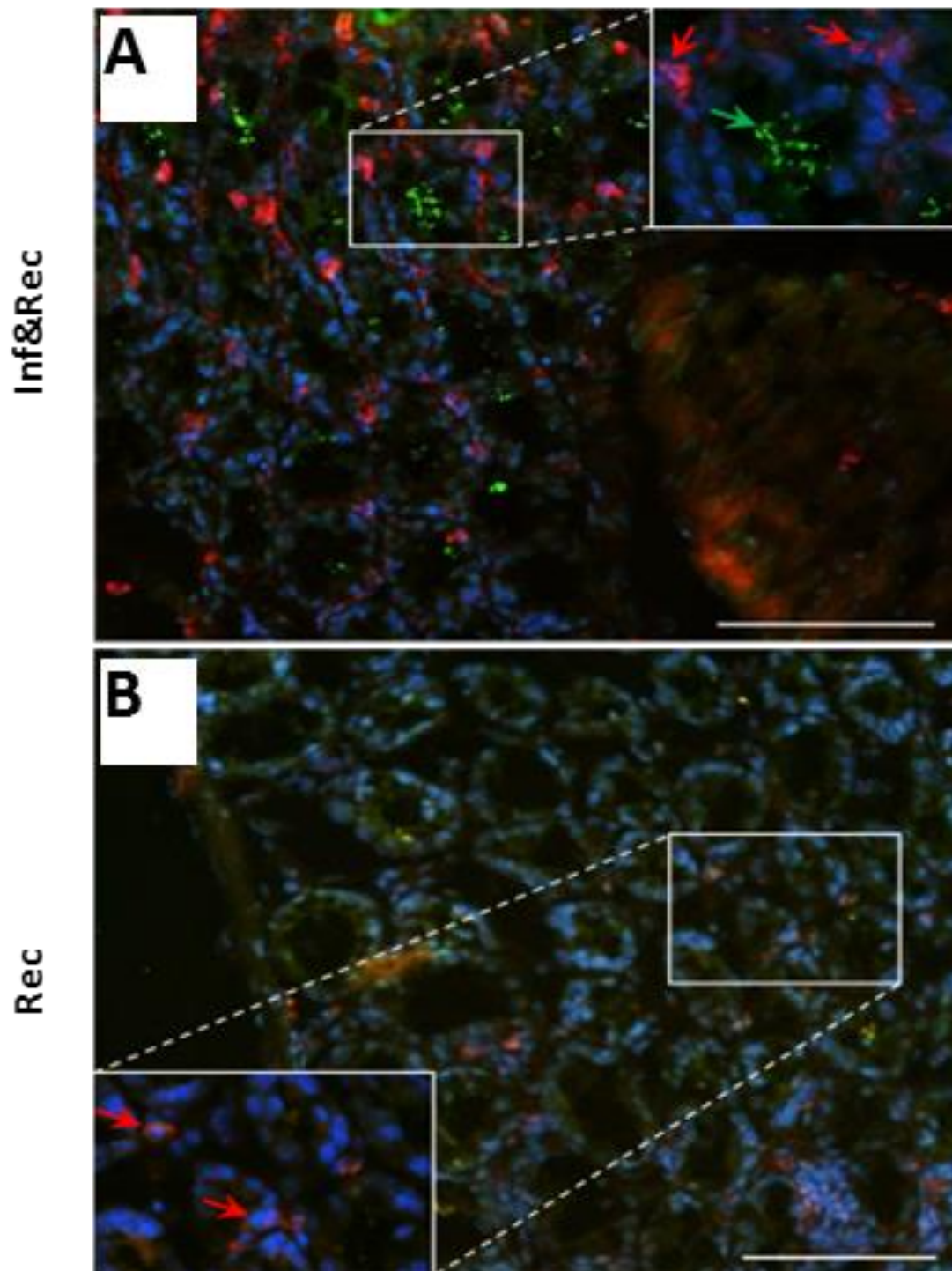


Abbildung 28: Immunohistochemische Darstellung von CD45 und MAP im murinen Kolon.

Murines Kolongewebe MAP-infizierter und $CD4^+CD45RB^{lo/int}$ T-Zellen rekonstituierter Mäuse und nicht infizierter, nur rekonstituierter Mäuse als Kontrolle. Proben wurden mit MAP (grün) und Leukozyten (CD45: rot) gefärbt. Grüne Pfeile zeigen Kolonien von MAP im Epithelium, rote Pfeile weisen auf Leukozyten, höchstwahrscheinlich Makrophagen, hin. Vergrößerungen x200 und x1000, Maßstab= 100 μ m. Blaufärbungen: DAPI

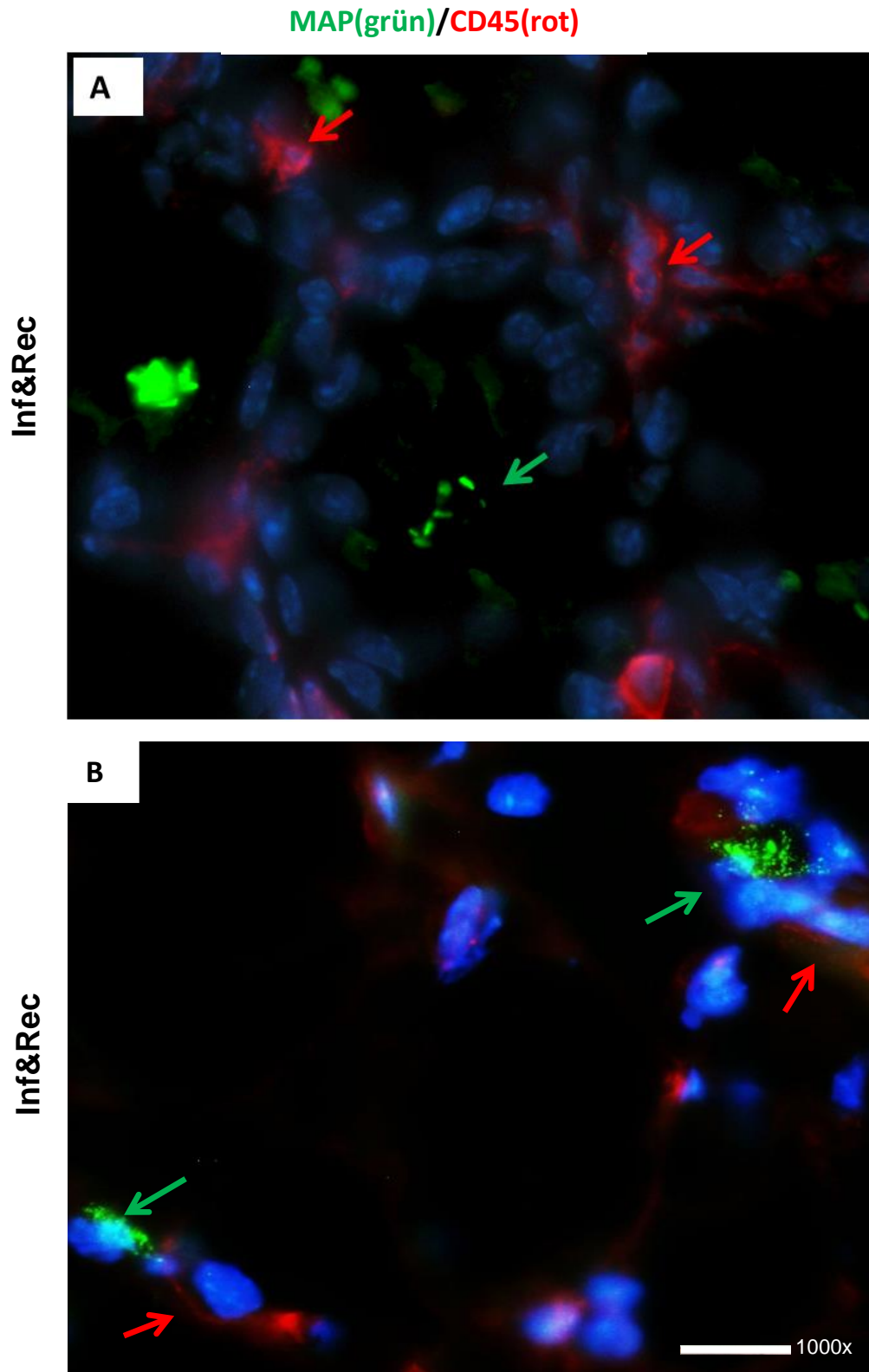


Abbildung 29: Immunohistochemische Darstellung von MAP- und CD45-positiver Zellen.

(A-B) Kolon MAP-infizierter und CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zellen-rekonstituierter Mäuse. Proben wurden mit MAP (grün) und Leukozyten (CD45: rot) gefärbt. Grüne Pfeile zeigen Kolonien von MAP und rote Pfeile weisen auf Leukozyten. Vergrößerungen x1000. Blaufärbungen: DAPI

MAP(grün)/MMP-9(rot)

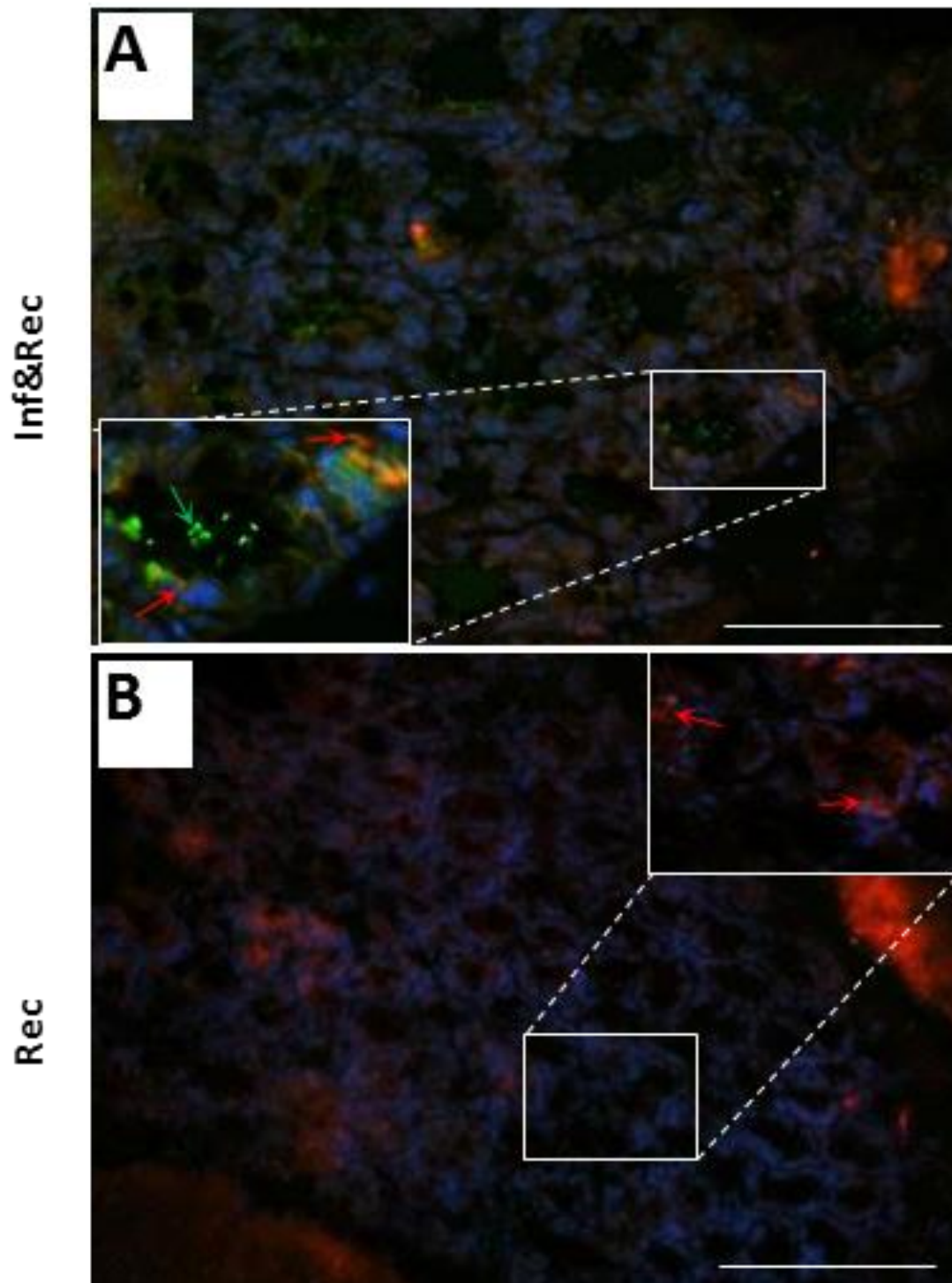


Abbildung 30: Lokalisation von intrazellulärer MAP-Kolonien und MMP-9-positiven Zellen.

Von murinen Kolon MAP-infizierter und $CD4^+CD45RB^{lo/int}$ T-Zellen-rekonstituierter Mäuse und nicht infizierter, nur rekonstituierter Mäuse als Kontrolle. Proben wurden mit MAP (grün) und MMP-9 (rot) gefärbt. Grüne Pfeile deuten auf Kolonien intrazellulärer MAP. Rote Pfeile zeigen MMP-9-exprimierende Leukozyten. In rekonstituierten und nicht MAP-infizierten Tieren konnten keine MAP-Cluster beobachtet werden; sie wiesen histologisch eine normale Kolonmukosa auf. Vergrößerungen x200 und x1000, Maßstab= 100 μ m. Blaufärbungen: DAPI

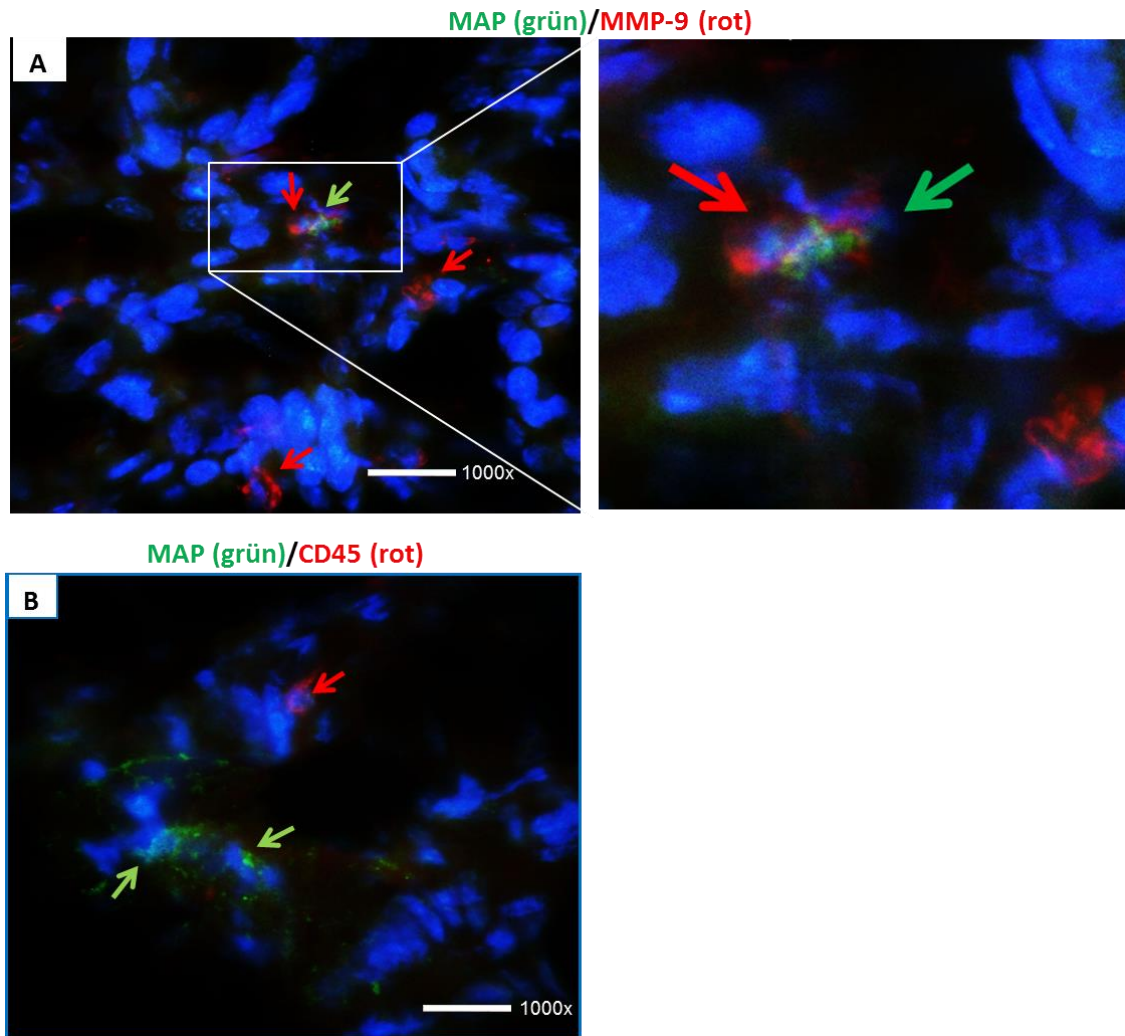


Abbildung 31: Immunhistologische Darstellung von MAP und MMP-9- sowie CD45 positiven Zellen.

Von murinem Kolon MAP-infizierter und CD4⁺CD45RB^{hi} T-Zellen rekonstituierter Mäuse
 (A) Proben wurden mit MAP (grün) und MMP-9 (rot) gefärbt. Grüne Pfeile deuten auf Kolonien intrazellulärer MAP. Rote Pfeile zeigen MMP-9-exprimierende Leukozyten. (B) Proben wurden mit MAP (grün) und CD45 (rot) gefärbt. In rekonstituierten und nicht MAP-infizierten Tieren konnten keine MAP-Cluster beobachtet werden; diese Tiere wiesen histologisch eine normale Kolonmukosa auf. Vergrößerungen x1000. Blaufärbungen: DAPI

5. Diskussion

5.1 Bedeutung der MAP-Infektion für Mensch und Tier

Aufgrund der ähnlichen Pathologien zwischen CD beim Menschen und Paratuberkulose bei Wiederkäuern stand MAP schon sehr lange als Zoonose-Erreger der CD in Verdacht. Allerdings konnten epidemiologische und klinische Studien bislang noch keine eindeutigen Hinweise auf eine Kausalität zwischen MAP und der Pathogenese der CD liefern (6). Obwohl Meta-Analysen einen Zusammenhang zwischen MAP-Infektion und CD bestätigen konnten (86,128), bleibt die pathogene Bedeutung von MAP unklar. Epidemiologische Daten sprechen gegen MAP als alleinigen Erreger der CD, da Menschen, die im Bereich der Viehzucht arbeiten und oft MAP-Erregern ausgesetzt sind, wie z. B. Bauern und die Bevölkerung in ländlichen Gebieten, keine erhöhten Raten von CD aufweisen (232). Der Zusammenhang zwischen MAP und CD könnte einerseits dadurch erklärt werden, dass MAP in der Tat ein wichtiger Faktor bei der Ursache der CD ist. Andererseits wäre es aber auch möglich, dass die Anwesenheit von MAP bei Patienten mit CD nicht auf die Ätiologie der CD wirkt, sondern lediglich eine Folge der Immundysregulation ist und erst entsteht, wenn bereits eine Entzündung vorhanden ist (sekundäre Besiedlung). Derzeit ist keine wirksame anti-MAP-Behandlung bekannt, die die Symptome bei CD deutlich verbessern würde. Außerdem ist es zur Zeit nicht möglich, MAP gänzlich aus der Umwelt und unserer Lebensmittelversorgung zu eliminieren. Selbst wenn dies möglich wäre, gäbe es keine überzeugenden Beweise dafür, dass sich dies auf die Prävalenz von CD auswirken würde (131).

In unseren Untersuchungen wies eine i.p. Infektion mit MAP in immunkomprimierten Mäusen keine signifikanten Expressionsauffälligkeiten in Bezug auf proinflammatorische Zytokine, MMPs und TLRs auf (Abb. 22, 23, 24). Diese Ergebnisse unterstreichen die Theorie, dass MAP nicht die alleinige Ursache für eine chronisch entzündliche Darmerkrankung ist. Dies deutet darauf hin, dass MAP isoliert keine Darmentzündung auslösen kann und somit nicht die direkte Ursache einer Darmentzündung ist. Dennoch ist dadurch ein Zusammenhang von MAP und CD nicht auszuschließen. Denn sowohl unsere Untersuchungen als auch andere lassen vermuten, dass MAP eine entzündungsverstärkende Auswirkung bei bereits vorhandener Colitis hat (233).

Unsere Ergebnisse zeigen desweiteren, dass MAP in immunsupprimierten und CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zell-rekonstituierten Mäusen zu einer proinflammatorischen Reaktion führt und untermauern somit die Rolle bei der Entzündung oder beim Forcieren einer Entzündung.

Die meisten Untersuchungen in Bezug auf CD konzentrieren sich mehr auf die Verbesserung des Krankheitsverlaufs als auf die Aufklärung des Zusammenhangs zwischen MAP und CD. Meist wird der Häufigkeit oder der Schwere von mykobakteriellen Erkrankungen kaum Bedeutung geschenkt, obwohl diese wichtige Faktoren für die Aufklärung des Zusammenhangs darstellen. Diese Tatsachen könnten unter Berücksichtigung und verstärkter Assoziation mit der Häufigkeit und Schwere von mykobakteriellen Erkrankungen gute Ansätze für weitere Untersuchungen zur Klärung des Zusammenhangs zwischen MAP und CD liefern. Folglich werden Forschungsarbeiten mit geeigneten in vivo-Modellen benötigt, um die mögliche Rolle von MAP für die Pathogenese des CD zu untersuchen. Die vorliegenden Ergebnisse können einen Beitrag dazu leisten, indem sie weitere Untersuchungen an dem von uns etablierten und charakterisierten Tiermodell ermöglichen.

5.2 Problematik des adäquaten Tiermodells für die MAP-Infektion

Geographische Variationen in der MAP-Exposition, große technische Schwierigkeiten der Kultivierung von MAP aus primären Gewebeproben und unterschiedliche Verläufe des komplexen Krankheitsbildes erschweren die Aufklärung der Bedeutung von MAP bei CD. Die Etablierung von Tiermodellen und die Verwendung von definierten, genetisch homogenen Versuchstiergruppen kann tiefere Einblicke in grundlegende Fragen der mukosalen Entzündung bieten, indem klar definierte Hypothesen anschließend beim Menschen untersucht werden. Leider konnte bislang kein eindeutiges Tiermodell für experimentelle Ansätze zur Prüfung der Assoziation von MAP mit CD etabliert werden (34,64,234). Dies könnte ein Grund dafür sein, weshalb der potenzielle Einfluss von MAP in der Pathogenese der CD immer noch unklar ist. Trotzdem wird der Zusammenhang zwischen MAP und CD kontrovers diskutiert. Bisher konnte mittels PCR-Assay eine verbesserte Diagnostik für die MAP-Infektion erreicht werden (34,234). Mehrere Studien konnten allerdings keine Kausalität zwischen CD und der Detektion von MAP-DNA herstellen (88,235,236). Im Allgemeinen ist ein Vergleich zwischen den einzelnen, bislang durchgeführten Studien aufgrund der Heterogenität der untersuchten Proben schwer darzustellen, da die Analysen entweder an frischen (88,237) oder eingebetteten Gewebeproben (235) oder gewebeunabhängig mit Blut (234,236) durchgeführt wurden. Darüber hinaus wurden für viele verschiedene Studien unterschiedliche Probenmaterialien und Methoden für

die Infektion, Kultivierung oder den Nachweis von MAP eingesetzt, wie MAP-DNA (34,88,234-236), MAP-Kultur (88,236), eine Kombination aus MAP-DNA und -Kultur (88,236), spezifische Antikörper gegen MAP-Epitope (234) und Immunhistochemie (235). Diese divergierenden Ansätze erschweren die Vergleichbarkeit der Untersuchungen untereinander und somit auch eine eindeutige Aussage über den Zusammenhang von MAP und CD.

Obwohl Nagetiere und insbesondere Mäuse keine natürlichen Wirte von MAP darstellen, sind spezifische Mausmodelle für eine MAP-Infektion entwickelt worden. Als Infektionsmodell für MAP werden wegen der Verfügbarkeit üblicherweise Mäuse von verschiedenen Inzuchtstämmen sowie normale und immunkomprimierte Mäuse verwendet - auch weil der Zugang zu gendefizienten und transgenen Mäusen einfacher ist als zu größeren Säugern (94,238,239). Derzeit sind immernoch keine optimalen MAP-Infektions-Mausmodelle vorhanden. Es sind weitere verbesserte experimentelle murine Modelle nötig, um die spezifischen Parameter einer MAP-Infektion zu etablieren und die Beteiligung von MAP in CD klären zu können.

Die Arbeit hat das Ziel verfolgt, ein Tiermodell zu entwickeln, dass die Erforschung der Pathogenese der Paratuberkulose (ggf. auch des CD) deutlich verbessert und die Aufklärung dieser Pathogenese zugrunde liegenden Mechanismen ermöglicht. Eine MAP-Infektion bei Wiederkäuern findet verstärkt postnatal durch fäkal-orale Übertragung statt; diese frühe MAP-Infektion bildet eine Übergangsperiode der Immunsuppression, was offensichtlich in späteren Jahren zur klinischen Erkrankung führt. Basierend auf diesen Überlegungen wurden 2 Ansätze verfolgt: die orale Exposition mit MAP und eine i.p. Injektion von MAP. Für die i.p. Infektion wurde immunkomprimierten Rag2^{-/-}-Mäusen, denen B- und T-Zellen fehlten, MAP i.p. injiziert und durch eine Komplementierung mit definierten Lymphozyten-Subpopulationen eine MAP-Infektion ermöglicht. Während CD45RB^{hi} T-Zellen in immundefizienten Mäusen zu einer mukosalen Entzündung führen, wurde dieses Phänomen bei einer Übertragung von CD45RB^{lo/int} T-Zellen nicht beobachtet (240). Der Ansatz der intraperitonealen MAP-Infektion in T-Zell-rekonstituierten BL/6-Mäusen erlaubt die Identifizierung der zellulären Immunfunktion, die für die MAP-induzierte Entzündung verantwortlich ist. Obwohl die Art und Weise der Infektion nicht dem physiologischen Infektionsweg von MAP entspricht, wurde in unserer Untersuchung eine konsequente chronische Infektion beobachtet. In diesem Zusammenhang wird oft der Einwand gebracht, dass im Gegensatz zu einer i.p. Injektion eine orale Infektion von adulten Mäusen mit MAP keine verlässliche Infektion sicherstelle und daher nicht geeignet sei, die MAP-Wirt-Interaktion zu untersuchen (241). Unsere Studie mit oraler Exposition von MAP konnte jedoch zeigen, dass eine kontrollierte orale MAP-Exposition von

Mäusen auch zu einer Darmpathologie und zu Entzündungen führen kann. Dieses Erkenntnis bildet eine gute Grundlage für weitere Untersuchungen, nicht zuletzt weil der natürliche Infektionsweg bei Tieren fäkal-oral erfolgt (41). Eine orale Infektion mit MAP könnte somit auch bei Menschen möglich sein, z.B. durch den Konsum von Milch oder den Verzehr von Fleisch infizierter Tiere. Bereits Untersuchungen aus dem Jahr 1998 konnten den Nachweis von MAP in pasteurisierter Milch liefern und somit das Überleben von MAP nach Pasteurisierungs- und Fermentationsprozessen belegen (242-246). Aus diesem Grund wird immer wieder MAP-kontaminierte Milch als mögliche Infektionsquelle diskutiert. Die Europäische Kommission hat MAP als potenziellen Zoonoseerreger eingestuft. Bedauerlicherweise gibt es derzeit kein Versuchstier-Modell, in dem die Eigenschaft von MAP untersucht werden kann, da immunkompetente Tiere nach oraler Infektion nicht oder nur systemisch erkranken (242,247).

Unsere Experimente haben erste Ansätze für ein geeignetes Tiermodell zur Assoziation von MAP und Darmentzündungen geliefert. Durch eine i.p. Infektion konnte eine systemische Ausbreitung von MAP, eine Infektion im Lebergewebe und signifikante Infektions-induzierte immunologische Veränderungen im Dickdarm dargelegt werden. Dies veranschaulicht den potenziellen Wert sowohl der oralen als auch der i.p. Infektion für die Analyse der MAP-induzierte Entzündung.

5.3 Diskussion zu den angewandten Tiermodellen

5.3.1 Orale MAP-Exposition in BALB/c Mäusen

Im Rahmen dieser Studie wurde untersucht, ob eine kontrollierte orale MAP-Exposition von Mäusen zu einer Darmpathologie und zu Entzündungen führen kann. Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass eine orale MAP-Exposition durchaus als Infektionsweg in Frage kommen kann.

Entzündungsinduzierte Expression von Matrix-Metalloproteinasen in oral MAP-infiziertem Darmgewebe

Neben einer erhöhten TNF- α Sekretion und T-Zell-Proliferation als zelluläre Antworten (80,81) gibt es erste Hinweise darauf, dass pathogene Mykobakterien auch eine Wirkung auf die extrazelluläre Matrix haben und somit zur Induktion der Expression von MMPs fähig sind. In der Tat konnten in vitro- und in vivo-Studien an Rindern und Mäusen zeigen, dass MMPs entzündliche Gewebeveränderungen und Zerstörungen durch Mykobakterien vermitteln (65,142). Des Weiteren sind MMPs wichtige Proteasen bei der Pathogenese von entzündlichen Darmerkrankungen, bei denen Zytokine ausgeschüttet werden, die wiederum eine Gewebeschädigung mit MMP-Expression hervorrufen. Aufgrund dieser vorangegangenen Erkenntnisse wurde für die vorliegenden Untersuchungen folgende **Hypothese** aufgestellt: **Eine intestinale MAP-Infektion kann zu einer erhöhten Expression von MMPs in murinem Darm führen.** Basierend auf früheren Ergebnissen und Veröffentlichungen unserer Arbeitsgruppe (203,248) wurden MMPs und TIMP-1 quantifiziert, welche eine wesentliche Bedeutung bei CD haben und eine pathogene Relevanz in Bezug auf Mykobakterien aufweisen. Die erhobenen Daten zeigen, dass eine orale Exposition mit MAP in der Lage ist, eine erhöhte Genexpression von MMP-2, MMP-9, MMP-13, MMP-14 und TIMP-1 (Abb. 13) im Kolon zu induzieren. Dieses Ergebnis bestätigt Aussagen früherer Studien, die MMP-9 eine besondere Bedeutung bei mykobakterieller Infektion zuschreiben (225,226). Als Antwort auf den Tuberkuloseerreger *Mykobakterium bovis* oder *Mycobacterium tuberculosis* erhöhen peritoneale Makrophagen stark die MMP-9-Expression in einer dosisabhängigen Weise, während MMP-2, obwohl diese auch erhöht waren, durchweg eine geringere Aktivität als MMP-9 zeigte (142). In anderen Untersuchungen konnten infiltrierte Makrophagen als mögliche Hauptquellen für MMP-8, -9 und -10 bei IBD und einem Maus-Modell von Colitis dargestellt werden (249,250). In der bronchoalveolaren Lavage-Flüssigkeit (Spülflüssigkeit) von Patienten mit Tuberkulose konnten erhöhte Werte von MMP-9 beobachtet werden. Auch durch Hitze

abgetötete *Mycobacterium tuberculosis* sowie mykobakterielle Zellwandkomponente sind in der Lage, MMP-9-mRNA in einer myelomonocytischen Zelllinie zu induzieren (251). In Bezug auf MAP konnte gezeigt werden, dass in PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) von Rindern, die mit JD infiziert waren, MMP-9 und deren wichtigster lokaler Inhibitor TIMP-1 nach Stimulation mit MAP hochreguliert waren (252,253).

Zusammen mit diesen Daten deuten vorliegende Beobachtungen einer erhöhten kolonalen MMP-2- und MMP-9-mRNA-Expression (Abb. 13) und Protein-Aktivität in vivo durch eine frühe MAP-Exposition (Abb. 14) auf eine wesentliche Rolle von MMP-2 und MMP-9 bei der Vermittlung von mykobakterieller Pathogenität hin.

Für den zellulären Ort der erhöhten MMP-9-Expression (immunhistologische Färbungen) konnten CD45⁺ Zellen als eine wichtige Quelle von MMP-9 in oral mit MAP-infizierten Mäusen identifiziert werden (Abb. 20). Darüber hinaus konnten Cluster von Zellen, die MMP-9 exprimieren, in unmittelbarer Nachbarschaft zu intramukosalen Lymphozyten-Aggregaten beobachtet werden. Diese mukosale Ansammlung von Leukozyten und die MMP-9 Expression bilden vermutlich den ersten Teil einer Wirtsantwort auf MAP. Der Organismus reagiert offenbar auf eine MAP-Infektion, indem Leukozyten vermehrt rekrutiert werden und MMP-9 aus der EZM exprimiert wird. MMP-9 ist insofern am Prozess der MAP-Infektion beteiligt, als ein durch MMP-9 initiiertes Abbau der EZM im Darm stattfindet. Durch diese infektiöse Veränderung im Darm kommt es zur Entzündung und zur Infiltration von Entzündungszellen. Diese inflammatorischen Zytokine und die Aktivierung von Leukozyten vermitteln anscheinend Gewebeschäden und verursachen somit die Zerstörung der Darmwand, was wiederum zu der typisch häufigen Darmentleerung führt (wie bei CD zu beobachten).

Diese Vermutungen werden durch die Literaturdaten gestützt, da MMP-9 von Granulozyten exprimiert wird und in Gewebe mit akuten Entzündungszuständen nachgewiesen werden konnte. Gewebe ohne Entzündungszeichen wies keine vermehrte MMP-9-Expression auf (184). Desweiteren waren MMP-1, -2, -3 und -9 in entzündlicher Mukosa von Patienten mit UC gegenüber gesunder Mukosa deutlich gesteigert. In immunhistochemischen Untersuchungen wurde MMP-9 als die am stärksten erhöhte Proteinase in CED identifiziert (182). Mehrere Studien konnten belegen, dass die Höhe der mukosalen MMP-Expression direkt mit der Krankheitsaktivität bei CED-Patienten korreliert (179,180,182).

Toll-like-Rezeptoren und die Rolle der Immunantwort gegen MAP

Toll-like-Rezeptoren (TLR) sind Proteine, die eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem spielen. Diese einzelnen, membranständigen, nicht-katalytischen Rezeptoren erkennen strukturell konservierte Moleküle, die aus Mikroben stammen. Durch diese Erkennung von MAP über TLRs werden Kaskaden aktiviert, die mit einer verstärkten Expression von Zytokinen einhergehen. Vor allem für TLR-2 und TLR-6 konnte gezeigt werden, dass sie für die angeborene Immunantwort gegen Mykobakterien bedeutsam sind (114,146,227,228,230,231,254-256). Die Quantifizierung der Expression von TLR-2 und TLR-6 in oral MAP-exponierten Mäusen und Kontrollen hat belegt, dass beide TLRs in Mäusen mit früher MAP-Exposition hochreguliert waren (Abb. 15). Die Immunhistologie bestätigte das Vorhandensein von TLR-2 auf der luminalen Seite der Enterozyten im Kolon, was dahingehend interpretiert werden kann, dass TLR-2 einen großen Teil der angeborenen Immunantwort gegen MAP bildet. Unsere Beobachtung einer gleichzeitigen Hochregulation von proinflammatorischen Zytokinen und Mitgliedern der TLR-Familie deutet auf eine kausale Beziehung hin und unterstreicht die Annahme, dass TLRs fähig sind, die Produktion von Zytokinen und die zelluläre Aktivierung als Antwort auf Mikroben zu vermitteln (257).

Die Beobachtungen einer verstärkten MMP-9-Expression in unmittelbarer Nähe der apikalen TLR-2-Expression in Enterozyten (Abb. 21) legen nahe, dass die TLR-2 induzierte MMP-Expression ein Bestandteil der Wirtsverteidigung gegen MAP ist. Dies unterstützt, dass die Immunantwort auf MAP über TLR eingeleitet wird und anschließend zur Expression von Zytokinen führt. Diese Zytokine sind dann vermutlich in der Lage, die Darmwand zu zerstören/destruieren und Leukozyten zu rekrutieren. Der Umbau der EZM und die Infiltration von Entzündungszellen sowie die damit verbundene Mukosadestruktion sind somit anzunehmen. Allerdings sind diese Assoziationen hypothetisch, und es sind weitere Studien notwendig, um sie zu verifizieren. Die Verwendung von TLR-2 depletierten Mäusen (TLR-2-Knockout-Mäuse) wäre eine Möglichkeit, um einen Kausalzusammenhang zwischen MAP, TLR-2 und MMPs zu belegen. Aufgrund des definierten Rahmens des Projektes und der zeitlichen Begrenzung konnte das aufgeführte Mausmodell nicht in unsere Experimente miteinbezogen werden.

Immunhistologischer Nachweis der Darmpathologie bei oraler MAP-Infektion

Um die Darmpathologie und die Auswirkungen einer Entzündung darzustellen, wurden immunhistologische Untersuchungen durchgeführt. Eine Besiedlung von MAP konnte mittels Immunfluoreszenz und Ziehl-Neelsen-Färbung im murinen Darmgewebe bestätigt werden. Da eine lange Zeitspanne gewählt wurde (65 Tage nach der ersten Exposition), um eine erfolgreiche Kolonisierung von MAP zu gewährleisten, kann ausgeschlossen werden, dass MAP nur vorübergehend den Darm der Mäuse besiedelt haben. Obwohl eine orale MAP-Exposition generell nicht zu einer makroskopischen Pathologie führte, konnten in MAP-exponierten Mäusen Aggregate von CD45⁺ Leukozyten in unmittelbarer Umgebung von MAP und ihren Sphäroplasten in der Lamina propria der Mukosa nachgewiesen werden. Diese Ansammlung von CD45⁺ Leukozyten in MAP-infizierten Mäusen gilt als mikroskopisches Merkmal für eine Infektion.

Abschließend geben unsere Ergebnisse Hinweise darauf, dass eine orale MAP-Exposition eine mukosale Expression von mehreren Mitgliedern der MMP-Familie zur Folge hat. Obwohl eine orale MAP-Exposition allein nicht zu einer makroskopischen Darmentzündung führte, machen die beobachteten intramukösen Leukozyten-Aggregate zusammen mit der erhöhten TLR-2-, TLR-6-, IL-1 β -, TNF- α -, MMP-2- und MMP-9-Expression in MAP-exponierten Mäusen vermutlich einen Teil der komplexen und noch ungenauen Immunantwort gegen MAP aus. Chambers et al. (258) zeigten in ihren Untersuchungen, dass eine Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* in monozystischen Zellen ebenfalls zu einer erhöhten Expression von MMPs (MMP-9) und zu einer TLR-vermittelten zellulären Immunreaktion führt. Allgemein spielen für Entzündungen durch Bakterien wahrscheinlich sowohl TLRs als auch MMPs eine Rolle. Kaneko et al. und Aoyama et al. beschreiben, dass parodontale Bakterien (*Porphyromonas gingivalis*) TLRs, insbesondere TLR-2, induzieren und die Entwicklung einer Herzfibrose beschleunigen. Infizierte Wildtyp Mäuse zeigten dabei auch ein erhöhtes MMP Muster (259,260).

Es ist klar, dass MAP ein sehr erfolgreicher intrazellulärer Erreger ist und spezielle Mechanismen entwickelt hat, um im Wirt zu überleben. Bestehende experimentelle und aus natürlicher Infektion (JD) abgeleitete Daten bezüglich der Immunreaktionen zeigen deutlich ein komplexes, aber dennoch unterschiedliches Muster. Die durch TLR eingeleitete Immunantwort, die Modulation der unterschiedlichen T-Zellpopulationen in MAP-infizierten Geweben und die genauen Mechanismen bei dem Fortschreiten der Entzündung durch MAP sowie die genomische Variationen von MAP müssen dennoch weiter untersucht werden (261).

5.3.2 Intraperitoneale MAP-Infektion in T-Zell-rekonstituierten BL/6-Mäusen

Rolle von CD4⁺ T-Zellen und proinflammatorischen Zytokinen bei der MAP-induzierten Pathologie

Allgemein ist die erste Reaktion des Organismus auf einen Erreger eine starke zellvermittelte Immunabwehr, die vor allem durch CD4⁺ T-Zellen, aber auch durch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen vermittelt wird (12,67,68). Bei im frühen Stadium erkrankten Rindern, die auf natürlichem Wege oder experimentell mit MAP infiziert wurden, konnte ein erhöhter Anteil an CD8⁺ T-Zellen und eine verminderte CD4⁺ T-Zell-Aktivität beobachtet werden. Zu einem späteren Stadium der Erkrankung jedoch wurden vermehrt CD4⁺ T-Zellen festgestellt (76). Generell wirken CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten durch die Synthese der Zytokine TNF- α und IFN- γ kontrollierend auf mykobakteriell infizierte Makrophagen (262). Interessanterweise wurde in der vorliegenden Untersuchung ein höherer Prozentsatz an CD4⁺ T-Zellen bei rekonstituierten und MAP-infizierten Mäusen beobachtet, als bei den Kontrollen. Möglicherweise führt eine MAP-Infektion zur Aktivierung von solchen CD4⁺ T-Zellen (Figur 1 in (240)). Zusätzliche Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Dr. Weiss, Braunschweig, konnten zeigen, dass eine systemische Entzündung, Granulombildung in der Leber und die intestinale Expression von TNF- α mit CD4⁺ T-Zell-Populationen in einem Wirkzusammenhang stehen, während CD8⁺ T-Zellen keine MAP-vermittelte Pathologie induzieren (persönliche Mitteilung). MAP ist bekannterweise fähig, die Bildung von Granulomen in der Leber zu induzieren. Im Detail wurden keine Granulome in Rag2^{-/-}-Kontroll-Mäusen oder nicht rekonstituierten Rag2^{-/-}-Mäusen mit einer MAP-Infektion beobachtet (Figur S1 in (240)). Diese Ergebnisse belegen, dass eine MAP-Infektion in immunsupprimierten Mäusen die Voraussetzung für die Entwicklung von T-Zell-vermittelter Granulombildung (wie bei CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zellen) oder ein stark fördernder Faktor in diesem Prozess (wie bei CD4⁺CD45RB^{hi} Rekonstitution) ist. Die Anwesenheit von einigen wenigen lebensfähigen MAP wurde mittels Ausplattieren von Leber-Homogenisaten oder alternativ mittels PCR von der AG Dr. Weiss aus Braunschweig bestätigt.

Diese Befunde zeigen die kritische Rolle des adaptiven Immunsystems (und insbesondere die kritische Rolle von CD4⁺ T-Zellen) und die Wirkung auf die Bildung von Granulomen. Es wurden keine Granulome in Mäusen gefunden, die mit CD8⁺ T-Zellen rekonstituiert wurden. Dies bestätigt, dass CD8⁺ T-Zellen nicht an der Granulombildung beteiligt sind (263,264). Überraschenderweise wurden Lebergranulome in 1 von 4 MAP-infizierten und mit CD4⁺CD45RB^{lo/int} rekonstituierten

Mäusen gefunden, aber nicht in nicht-infizierten Kontrollmäusen. Im Gegensatz dazu wurden Granulome im Lebergewebe von Mäusen mit der Rekonstitution von $CD4^+CD45RB^{hi}$ T-Zellen auch in Abwesenheit von MAP-Infektion beobachtet. In MAP-infizierten Tieren mit einer $CD4^+CD45RB^{hi}$ Rekonstitution wurden jedoch in allen 4 Mäusen mehrere und deutlich größere Granulome gefunden als bei Mäusen, die nur eine $CD4^+CD45RB^{hi}$ Rekonstitution ohne MAP-Infektion erhalten haben (Figur 4 in (240)).

Zusammenfassend kann festgehalten werden: Die durch $CD4^+CD45RB^{lo/int}$ T-Zell vermittelte Bildung von Granulomen wurde ausschließlich in MAP-infizierten Mäusen nachgewiesen, während die Übertragung von $CD4^+CD45RB^{hi}$ T-Zellen auch in Abwesenheit einer MAP-Infektion die Bildung von Granulomen induzierte. Dies verdeutlicht nochmals, wie bereits berichtet (66), das stark entzündliche Potenzial dieser Zellpopulation. Dennoch waren in Mäusen mit einer MAP-Infektion und einer Rekonstitution durch $CD4^+CD45RB^{hi}$ T-Zellen die Granulome deutlich in Zahl und Größe erhöht. Es liegt die Annahme nahe, dass eine MAP-Infektion das Potenzial von verschiedenen T-Zell-Subpopulationen erhöht, um Entzündungszellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in Richtung einer Infektion zu lenken. Somit belegt diese Studie, dass eine i.p. Infektion zu einer systemischen Ausbreitung von MAP, einer Infektion des Lebergewebes und zu Infektions-induzierten immunologischen Veränderungen im Darm führt.

$CD4^+CD45RB^{hi}$ T-Zellen weisen per se proinflammatorische Eigenschaften auf und sind dafür bekannt, Colitis bei immunsupprimierten Mäusen zu induzieren vermutlich aufgrund der Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen (96,97). Basierend auf dieser Tatsache konzentrierten sich die vorliegenden Analysen auf die Wirkung von $CD4^+CD45RB^{lo/int}$ T-Zellen und auf die Frage, ob diese durch die Wechselwirkung mit MAP in entzündliche T-Zellen umgewandelt wurden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass in Anwesenheit von MAP $CD4^+CD45RB^{lo/int}$ T-Zellen im Stande sind, selbst Entzündungsfaktoren zu produzieren oder andere Zellen zur Produktion zu stimulieren, und sie damit in einen proinflammatorischen Phänotyp umgewandelt werden können. Mehrere Marker für Entzündung, Geweberegeneration und die Erkennung von MAP wurden für die Fragestellung quantifiziert.

Die Expressionsanalysen von $TNF-\alpha$ und $IL-1\beta$ als starke und potente proinflammatorische Zytokine in den durchgeführten Mausexperimenten ermöglichten es, die Auswirkungen der kombinierten MAP-Infektion und Rekonstitution mit $CD4^+CD45RB^{lo/int}$ T-Zellen und der beiden Komponenten (MAP und $CD4^+CD45RB^{lo/int}$ T-Zellen) allein in Bezug auf die Expression der Zytokine zu analysieren. Mit diesem Ansatz konnte gezeigt werden, dass eine MAP-Infektion und anschließende

Rekonstitution mit CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zellen zu einer starken Induktion von TNF- α (IL-1 β nur tendenziell) führt (Abb. 22). Allerdings wurden diese Erhöhungen nicht in Mäusen mit einer alleinigen MAP-Infektion oder einer alleinigen CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zell Rekonstitution beobachtet. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass MAP die rekonstituierten CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zellen wahrscheinlich in einen proinflammatorischen Phänotyp umwandelt.

Unsere Schlussfolgerungen stehen auch im Einklang mit der Literatur: Erhöhte TNF- α -Spiegel wurden bei mehreren Erkrankungen mit Autoimmun-Komponenten beobachtet, einschließlich rheumatoider Arthritis und CD und vor allem in Zusammenhang mit MAP-Infektionen sowie in in vitro-Studien, die eine Hochregulation von TNF- α in mukosalen Zellkulturen aus MAP-positiven CD-Patienten aufwiesen (80,81,233,265-268). Dies steht auch im Zusammenhang mit der Granulomabildung, denn Zytokine und Immunzellen, insbesondere T-Zellen sind für die Granulomformation erforderlich (269,270). TNF- α trägt somit zur allgemeinen Pathogenese einer entzündlichen Erkrankung durch eine verstärkte Aktivierung einer Entzündung, vermehrte Zellproliferation und die Änderung der Permeabilität des Epithels bei (271).

Bedeutung von Matrix-Metalloproteinen bei mykobakterieller i.p. Infektion

Wir haben das Augenmerk auch auf jene Faktoren gerichtet, die für die Aufrechterhaltung der Entzündung und Gewebeerstörung verantwortlich sind (152,157), um damit die Systematik einer MAP-Infektion in Bezug auf eine zelluläre Darmentzündung zu verdeutlichen. Aufgrund von früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe (203,248) wurden MMPs und TIMP-1 quantifiziert, die wichtige Enzyme der Gewebeerstörung bei CED darstellen sowie eine pathogene Bedeutung während einer mykobakteriellen Infektion haben (142). Frühere Studien haben MMP-9 als Schlüsselenzym während einer mykobakteriellen Infektion identifiziert (225,226). Unsere Ergebnisse belegen die wichtige Rolle von MMP-9 bei der Vermittlung von mykobakterieller Pathogenität (216). Abgesehen von MMP-9 konnte ebenfalls eine Induktion von MMP-13 und MMP-14 in MAP-infizierten und T-Zellen rekonstituierten Mäusen ermittelt werden (Abb. 24). Dies untermauert unsere Hypothese, dass beide - MAP und CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zellen - möglicherweise in einer Wechselwirkung stehen und diese entscheidend für die Einleitung und Aufrechterhaltung von Entzündungen durch die Hochregulation von MMPs in unserem Modell ist. Dennoch konnte keine Gewebeerstörung durch histologische Untersuchungen beobachtet werden, weshalb die Rolle der induzierten Expression von MMPs im Zusammenspiel mit CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zellen noch klärungsbedürftig ist.

Erkennung von MAP durch Toll-like-Rezeptoren

Bei der Einleitung einer angeborenen Immunantwort gegen Infektionserreger spielen TLRs eine Schlüsselrolle. Die Erkennung von Erregern erfolgt durch PAMP in der frühen Phase der Abwehrreaktion und die TLRs aktivieren daraufhin eine intrazelluläre Kaskade, wodurch die Expression von Entzündungsgenen induziert wird. Diese Entzündungsparameter bilden den Antrieb des Immunsystems, um eindringende Pathogene zu beseitigen (272). Unseren Ergebnissen zufolge spielt dabei TLR-6 eine wichtige Rolle, obwohl es nicht viele Informationen darüber gibt, konnten einige Studien aufzeigen, dass dieser Rezeptor eine Bedeutung bei der Erkennung von Pathogenen und der Immunantwort hat (273,274). Besonders für TLR-2 und TLR-6 konnte aufgezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunantwort gegen mykobakterielle Infektionen spielen (114,146,228,275). TLR-2 steht in Verbindung mit TLR-6 und erkennt bakterielle diacylierte Lipopeptide und Peptidoglycan von grampositiven Bakterien und initiiert die Makrophagen-Antwort auf diese Liganden (227,231,276,277). Des Weiteren sind TLR-2/TLR-6-Heterodimere an der Erkennung von mykobakteriellen Antigenen beteiligt (146,254). Beide, TLR-2 und TLR-6, waren in den Därmen von Schafen mit JD hochreguliert (228,256). TLR-2 und TLR-6 wirken anscheinend zusammen, um Makrophagen durch Erkennung von Peptidoglycan grampositiver Bakterien zu aktivieren (227).

In Übereinstimmung mit diesen Daten über die Rolle der TLR-6 für die Erkennung von MAP wurde in unserer Studie eine signifikant erhöhte Expression von TLR-6 sowie eine starke Induktion von TNF- α (IL-1 β tendentiell) nach einer MAP-Infektion in CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zellen rekonstituierten Rag2^{-/-}-Mäusen (Abb.23) beobachtet. Nach Marinho et al. (278) wird TLR-6 für die Aktivierung von MAPK und NF- κ B in BMDCs und die weitere Produktion von proinflammatorischen Zytokinen benötigt und ist somit für die volle Resistenz gegen *M. avium* Infektionen erforderlich (279). Speziell Th-1 Zytokine sind für die Resistenz von *M. avium* Infektionen nötig (280,281). Erste Studien an Menschen konnten im Zusammenhang mit Mykobakterien zeigen, dass TLR-6 Polymorphismen mit niedrigerer IL-6-Produktion, NF- κ B-Signal-Aktivierung und in bestimmten Bevölkerungsgruppen mit einem erhöhten Risiko an Tuberkulose (TB) zu erkranken, einhergeht (282,283).

Unsere Beobachtung einer gleichzeitigen Hochregulation von proinflammatorischen Zytokinen und TLR-6 deutet auf eine kausale Beziehung hin und unterstreicht die Vorstellung, dass TLRs fähig sind, die Produktion von Zytokinen und die zelluläre Aktivierung als Antwort auf Mikroben zu vermitteln (257). Die Gesamtheit dieser Signale (Ausschüttung pro inflammatorischer Zytokine und TLR) zeigt das Vorkommen pathogener Strukturen an oder deutet mittels der Expression von Stressproteinen auf

pathologische Veränderungen innerhalb des Körpers hin und generiert ein sogenanntes „Danger-Signal“ (284,285). Somit ist auch die Produktion von Zytokinen wichtig für die Aktivierung von Immunzellen und für die Kontrolle der Infektion. Diese Erkenntnisse verdeutlichen besonders die Relevanz von TLR-6 bei der Erkennung von MAP im Zusammenhang mit der durch MAP hervorgerufenen Entzündung im Darm.

Immunhistologischer Nachweis der Darmpathologie bei i.p. MAP-Infektion

Mykobakterien infizieren bekannterweise den Wirt; sie „verstecken sich“, indem sie sich in Makrophagen einnisten und es zu einer intrazellulären Proliferation der Bakterien innerhalb der infizierten Makrophagen kommt. Somit findet die Erreger-Wirt-Interaktion während einer MAP-Infektion hauptsächlich innerhalb der Makrophagen statt, die proinflammatorische und zytotoxische Immunantwort ist dabei essenziell für die Kontrolle der Infektion (3,46,53,64,65). In diesem Zusammenhang konnten in den Immunfluoreszenzfärbungen mittels polyklonalem Antiserum MAP im murinen Kolon MAP-infizierten und CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zellen-rekonstituierten Mäusen identifiziert werden (Abb. 26). Weitere Immunfluoreszenzfärbungen zeigten intrazelluläre Cluster von MAP, umgeben von Aggregaten aus CD45⁺-Leukozyten (Abb. 27). Diese Beobachtungen verdeutlichen nochmals, dass sich MAP in Makrophagen einnisten und die Produktion von Zytokinen antreiben kann. Die Infiltration von CD45⁺ Leukozyten in MAP-infizierten und CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zellen rekonstituierten Mäusen wird somit durch diese Färbungen bestätigt. Eine spezifische Färbung mittels F4/80 (Makrophagen Antikörper) und MMP-9 wies eine Makrophagen Akkumulation neben MMP-9-positiven Zellen nach und untermauert nochmals die Bedeutung von MMP-9 in der mykobakteriellen Infektion des Darms (Abb. 27). MMP-9 wird in den neutrophilen Granulozyten und Makrophagen gebildet und wird durch verschiedene Entzündungszellen in neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen stark exprimiert. Dies ist entscheidend bei der Ausbreitung von malignen Tumoren und Entzündungsprozessen (149,161,162,206). Unsere Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass es in MAP-infizierten und CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zellen rekonstituierten Mäusen zu einer Entzündung sowie zu einem durch MMP-9 initiierten Umbau der EZM und damit verbundener Mukosadestruktion kommt. Mehrere Studien konnten belegen, dass die Höhe der mukosalen MMP-Expression direkt mit der Krankheitsaktivität bei CED-Patienten korreliert (179,180,182). Dies legt nahe, dass MMPs während der Infektion mit pathogenen MAP hochreguliert werden, wie auch in der Literatur bereits angenommen (142,198). MMPs regulieren eine Vielzahl von Nicht-Matrix-Substraten wie Chemokine,

Zytokine und Wachstumsfaktoren (151,154). Sie können Entzündungen durch direkte proteolytische Prozessierung von entzündlichen Zytokinen entweder stimulieren oder aufrechterhalten (155).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass durch die T-Zellen Rekonstitution der MAP-infizierten immunkomprimierten Rag2^{-/-}-Mäuse erstmals gezeigt wurde, dass die MAP-induzierte systemische Entzündung vor allem durch CD4⁺CD45RB^{hi} T-Zellen forciert wird. Dabei sind CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zellen unter dem Einfluss von MAP während einer enterischen Entzündung der Darmschleimhaut in der Lage, sich in Effektorzellen umzuwandeln. Des Weiteren sind beide, MAP und T-Zellen, für die Induktion einer Entzündung und der Gewebepathologie erforderlich.

Die vorliegenden Untersuchungen konnten darlegen, dass die Induktion von TNF- α und gewebeabbauenden Proteasen (MMPs und TIMPs) nur bei gleichzeitiger Gegenwart von MAP und CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zellen vorlag, nicht aber unter Anwesenheit nur eines der beiden Faktoren. Diese Ergebnisse verdeutlichen daher, dass MAP nach seiner Erkennung im Organismus in der Lage ist, eine Immunantwort im Körper einzuleiten, die eine proinflammatorische und gewebezerstörende Umgebung herbeiführt, die wiederum später zu einer MMP-9 initiierte Degeneration der EZM führen kann (286,287). Auch eine Schädigung der Schleimhaut selbst kann MAP helfen im Dickdarmgewebe zu überleben, z. B. bei bestehender Entzündung. Die Anwesenheit von MAP oder MAP-infizierten Makrophagen könnte die Heilungsprozesse beeinträchtigen und es Darmbakterien ermöglichen, in das Darmgewebe einzudringen (233).

MAP konnte durch Immunhistochemie und PCR nicht durchgehend im Kolongewebe nachgewiesen werden. Somit kann, selbst in Abwesenheit von einer hohen Keimbelastung, eine MAP-Infektion die Verlagerung von CD4⁺ T-Zellen zu einer Entzündung vorantreiben und die Bildung von Granulomen in Lebergewebe herbeiführen (240).

Abschließend konnte durch unsere Untersuchungen ein Infektionsmodell etabliert werden, welches die immunhistochemische Analyse der MAP-induzierten Stimulation und der proinflammatorischen Aktivität von CD4⁺ T-Zellen ermöglicht. Nach einer systemischen Infektion konnten signifikante Anzeichen einer Infektion, nämlich Granulombildung in der Leber und Entzündungsreaktionen im Dickdarm, beobachtet werden. Zusätzlich konnten lebensfähige MAP aus entzündetem Gewebe kultiviert sowie das MAP-induzierte entzündliche Potenzial von T-Zell-Subpopulationen ausgewertet werden. Alle Zeichen einer Inflammation, wie eine Erhöhung des Milzgewichts und Granulombildung in der Leber, konnten mit CD4⁺T-Zellen in

Verbindung gebracht werden (240). Unsere Arbeit zeigt Mechanismen auf, mit denen MAP entzündliche Reaktionen in Abhängigkeit von der T-Zell-Aktivität induziert. Diese Experimente tragen letztlich zu einem besseren Verständnis der Rolle von MAP in chronisch-entzündlichen Erkrankungen bei und bieten die Grundlage für weitere Untersuchungen.

5.4 Limitationen der Tiermodelle

In der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen an murinem Darmgewebe durchgeführt. Die mikroskopische Entzündung war lediglich auf das Kolon begrenzt, und trotz des Vorhandenseins von inflammatorischen Zellen und inflammatorischen Effektormolekülen konnten keine histologischen Veränderungen beobachtet werden. Als methodische Limitation könnte hierfür der Beobachtungszeitraum genannt werden. Eventuell war nämlich der Beobachtungszeitraum nach der T-Zell-Rekonstitution nicht lange genug, was die beschränkte mikroskopische Entzündung im Dickdarm trotz der Anwesenheit von Entzündungszellen erklären würde. Des Weiteren wäre es denkbar, dass ein weiterer "Hit", wie die genetische Prädisposition, für das Auftreten einer ausgeprägten makroskopischen Colitis notwendig ist, und dass MAP durch die Induktion von Zytokinen einen potenten Auslöser für Colitis bildet. Zukünftige weitere Untersuchungen dieses Themas sind daher erforderlich. Die hier vorgestellten Ergebnisse liefern ein geeignetes Tiermodell dafür.

Zur weiteren Evaluation könnten TNF α -Knockout-Mäuse einsetzen werden, um die Hauptzytokin-Komponente auszuschalten. An diesen Tieren würde die anschließende orale und/oder i.p. MAP-Infektion durchführbar sein, um den Stellenwert von TNF- α für die MAP-Infektion herauszuarbeiten. Weiterhin könnte man den Ansatz mit heterozygoten und Wildtyp-Mäusen wiederholen, um die genetische Prädisposition zu analysieren.

Diese Gedanken der genetischen Prädisposition beruhen auf epidemiologischen Daten und gehen von einer Dysregulation der Immunantwort in der menschlichen Darmschleimhaut mit genetischer Disposition aus (288). Mehrere Aspekte der epidemiologischen Forschung von Morbus Crohn stützen diese Theorie, dass die Genetik einen starken Einfluss auf die Pathogenese der Erkrankung hat. In Zwillingsstudien wurden erhöhte Konkordanzraten bei monozygoten (eineiigen) Zwillingen (35-58 %) im Vergleich zu dizygoten (zweieiigen) Zwillingen (3-7 %) festgestellt (289-292). Diese Konkordanzraten bei eineiigen und zweieiigen Zwillingen liefern weitere Hinweise für die Bedeutung der genetischen Faktoren (293). Die Konkordanzraten für Morbus Crohn betrugen 36 % für eineiige und 4 % für zweieiige

Zwillingspaare (entsprechend für CU 16 % und 4 %) (291,292,294,295). Noch höhere Konkordanzraten bei Zwillingspaaren mit Morbus Crohn sind beschrieben mit 44 % für eineiige Zwillingspaare und 3,8 % für zweieiige Zwillingspaare (296). Zusammenfassend kann man sagen, dass genetische Faktoren in der Ätiologie der CED eine bedeutende Rolle spielen. Allerdings sind genetische Veränderungen sicher nicht der einzige Faktor. Das Zusammenspiel aus genetischen und immunregulatorischen Faktoren sowie Umwelteinflüssen wird zwar vermutet, die genaue Ätiologie bleibt jedoch weitgehend unklar. Ein Ansatz (mit unseren Versuchsgrundlagen) mit heterozygoten und Wildtyp-Mäusen im Zusammenhang mit entzündlichen Darmerkrankungen und MAP könnte dazu dienen, die genetische Prädisposition in diesem Zusammenhang zu analysieren.

6. Zusammenfassung

Aufgrund der pathologischen Ähnlichkeiten zwischen Morbus Crohn beim Menschen und Paratuberkulose bei Wiederkäuern wird *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) schon sehr lange als Zoonose-Erreger betrachtet. Epidemiologische und klinische Studien konnten bislang allerdings keine eindeutigen Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang zwischen MAP und der Pathogenese des Morbus Crohn liefern. Bei der Erkennung pathogener Bestandteile spielen die Toll-Like-Rezeptoren eine wichtige Rolle, da sie Abwehrzellen aktivieren können, die dann wiederum eine Entzündungsreaktion hervorrufen.

Bei einer Vielzahl inflammatorischer Erkrankungen wurde die Regulation von Matrix-Metalloproteinasen durch Toll-like-Rezeptoren nachgewiesen. Matrix-Metalloproteinasen gehören zu einer Familie membrangebundener, zinkabhängiger, Endopeptidasen mit der Fähigkeit, verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix abzubauen. Sie sind an der Mukosadestruktion, der Inflammations-assoziierten Karzinogenese und der mukosalen Barrierefunktion sowie der Metastasierung beteiligt. Das Ziel dieser Arbeit war die Erforschung der durch MAP stimulierten Expression von Matrix-Metalloproteinasen sowie Toll-like-Rezeptoren in jungen BALB/c-Mäusen mit oraler MAP-Exposition und intraperitonealer MAP-Exposition im Rag2^{-/-}-Maus Modell. Eine Rekonstitutions-induzierte Colitis sollte des Weiteren die besondere Betrachtung der Beteiligung von T-Zellen ermöglichen.

Die Ergebnisse aus den Versuchen mit oraler MAP-Exposition geben Hinweise darauf, dass eine orale MAP-Exposition zu einer mukosalen Expression mehrerer Matrix-Metalloproteinasen (MMP-2, -7, -9, -13, -14) sowie TIMP-1 und -2 führt. Obwohl eine orale Exposition mit MAP nicht zu makroskopischer Darmentzündung führte, stellen die beobachteten intramukösen Leukozyten-Aggregate zusammen mit der erhöhten TLR-2-, TLR-6-, IL-1β-, TNF-α-, MMP-2- und MMP-9-Expression in MAP-exponierten Mäusen vermutlich einen Teil der Immunantwort gegen MAP dar.

Um die Wirkung von MAP in einem gesicherten Infektionsmodell zu beobachten, wurde ein Rag2^{-/-}-Maus-Modell der Rekonstitutions-induzierten Colitis gewählt und die MAP-stimulierte Expression von TLRs und MMPs analysiert.

Unsere Versuche zeigten, dass beides, MAP und T-Zellen, für die Induktion einer Entzündung und die Gewebepathologie erforderlich sind. Die Induktion von TNF-α, TLR-6 und MMP-9, -13, -14 sowie TIMP-1 wurde nur in Gegenwart von MAP und CD4⁺CD45RB^{lo/int} T-Zellen beobachtet, nicht unter Einzeleinwirkung. Dies führte zu der Annahme, dass MAP nach seiner Identifikation durch den Organismus in der Lage ist,

eine Immunantwort mit proinflammatorischen und gewebezerstörenden Mechanismen, die im weiteren Verlauf wiederum zu einer manifestierten Entzündung führen können.

In beiden MAP-Infektionsmodellen konnten mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen MAP-Kolonien lokalisiert und MMP-9 exprimierende Zellen identifiziert werden. Durch diese Untersuchungen wurde ein Infektionsmodell etabliert, das die Analyse der MAP-induzierten Stimulation und der proinflammatorischen Aktivität von CD4⁺-T-Zellen ermöglicht. Nach einer intraperitonealen Infektion wurden signifikante Anzeichen einer Infektion, Granulombildung in der Leber und Entzündungsreaktionen im Dickdarm beobachtet. Zusätzlich konnten lebensfähige MAP aus entzündetem Gewebe kultiviert werden. Alle Anzeichen einer Inflammation, wie eine Erhöhung des Milzgewichts und Granulombildung in der Leber, konnten mit CD4⁺-T-Zellen in Verbindung gebracht werden. Unabhängig von den experimentell unterschiedlichen MAP-Infektionswegen, kann MAP als "krankheitsfördernde" Einflussgröße betrachtet werden, die bei bestehender Entzündung einen verstärkenden Faktor darstellt.

Unsere Arbeit zeigt neue Mechanismen auf, mit denen MAP entzündliche Reaktionen in Abhängigkeit von T-Zell-Aktivität induziert. Dies führt zu einem besseren Verständnis der Bedeutung von MAP in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und bietet die Grundlage für weitere MAP-Analysen im Tiermodell.

7. Summary

Based on the pathological similarities between CD in humans and Johne's disease in ruminants MAP has been proposed as a zoonosis since a very long time. However epidemiological and clinical studies have not provided clear evidence of a causal relationship between MAP and the pathogenesis of CD so far. In the recognition of pathogenic components and pathogens, including *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP), the Toll-like receptors play an important role, as they can activate immune cells, which then cause an inflammation.

In a variety of inflammatory disease the regulation of the matrix metalloproteinases (MMPs) has been demonstrated by TLRs. MMPs belong to a family zinc-dependent, endogenous proteases with the ability to degrade various components of the extracellular matrix (ECM). MMPs are involved in mukosal destruction, inflammation associated carcinogenesis and mucosal barrier function, as well as in metastasis.

The aim of this study was the analysis of MAP infection-stimulated expression of MMPs and TLRs in infant BALB/c mice with an oral MAP exposure or Rag2^{-/-} mice model of reconstitution-induced colitis with additional attention to the participation of T- cells.

The results from the experiments with the MAP oral exposure provide evidence that oral exposure of MAP performs a mucosal expression of several members of the MMP family. Although only an oral MAP exposure does not lead to macroscopic intestinal inflammation observed intramucosal leukocyte aggregates, together with the increased TLR-2, TLR-6, IL-1 β , TNF- α , MMP-2 and MMP-9 activity in MAP exposed mice can probably represent a part of the immune response against MAP.

To observe the effect of MAP in another infection method and to elucidate the MAP infection-stimulated expression of TLRs and MMPs in a Rag2^{-/-} mice model of reconstitution-induced colitis is chosen. This experimental set-up makes clear that both MAP bacteria and T-cells are required for the induction of inflammation and tissue pathology. The induction of TNF- α , TLR-6, and tissue degrading proteases (MMP- 9, - 13, -14, TIMP-1) are enhanced only in the simultaneous presence of MAP and CD4⁺CD45RB^{lo/int} T cells, but not under conditions where only one of the factors is present. This led to the assumption that MAP is able to initiate an immune response that induces a pro-inflammatory and tissue-destructive environment, which might lead to a later manifest inflammation. In both models we were able to identify MAP colonies and MMP-9-expressing cells in immunofluorescence stainings.

These studies show infection models, which enable the analysis of the MAP-induced stimulation and pro-inflammatory activity of CD4⁺ T cells. According to a systemic infection, significant signs of infection, granuloma formation in the liver and inflammation in the large intestine were observed. In addition, viable MAP bacteria could be cultured from inflamed tissue as well as the MAP-induced inflammatory potential of T-cell subpopulations are evaluated. All signs of inflammation, such as an increase in spleen weight and granuloma formation in the liver, could be associated with CD4⁺ T cells (225).

Our work shows new mechanisms where MAP induced inflammatory reactions subject to T-cell activity, which ultimately offers a better understanding of the role of MAP in chronic inflammatory diseases and facilitates further investigations of MAP in animal models.

8. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Mögliche MAP-Exposition | 1 |
| Abbildung 2: Aufbau der mykobakteriellen Zellwand | 4 |
| Abbildung 3: Mykobakterielles Eindringen in die Darmflora | 7 |
| Abbildung 4: Phagozytose bei Mykobakterien | 9 |
| Abbildung 5: Entzündliche Darmerkrankungen..... | 14 |
| Abbildung 6: NF κ B -Signalweg am Beispiel von TLR-9. | 18 |
| Abbildung 7: Domänenstruktur der Matrix-Metalloproteinasen. | 23 |
| Abbildung 8: Aktivierung und Wirkung von Matrix-Metalloproteinasen..... | 25 |
| Abbildung 9: Übersicht über das experimentelle Protokoll (oral MAP). | 31 |
| Abbildung 10: Übersicht über das experimentelle Protokoll (i.p. MAP). | 34 |
| Abbildung 11: Prinzip der RNA-Isolation. | 37 |
| Abbildung 12: Expression von IL-1 β und TNF- α nach MAP-Exposition | 51 |
| Abbildung 13: Expression von MMPs und TIMP-1 nach früher und später MAP-Exposition | 52 |
| Abbildung 14: Gelatine Zymographie zur Darstellung der MMP-9 Aktivität | 53 |
| Abbildung 15: Genexpression von TLRs nach MAP-Exposition | 54 |
| Abbildung 16: Balkengrafik der Korrelationskoeffizienten..... | 55 |
| Abbildung 17: Ziehl-Neelsen-Färbung..... | 56 |
| Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbungen von MAP/CD45 im Kolon mit MAP-Exposition | 57 |
| Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbungen von MAP/CD45 im murinen Kolon (Kontrolle) | 58 |
| Abbildung 20: Zelluläre Lokalisation von MMP-9 in MAP-exponierten Mäusen | 60 |
| Abbildung 21: Zelluläre Lokalisation von TLR-2 in MAP-exponierten Mäusen..... | 61 |
| Abbildung 22: CD45+/MMP-9+ Zellzahl im Dickdarm. | 62 |
| Abbildung 23: TNF- α - und IL-1 β -Expression. | 63 |
| Abbildung 24: MMP-Genexpression..... | 65 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 25: TLR Expression mittels RT-PCR. | 66 |
| Abbildung 26: Immunhistochemische Lokalisation von MAP in Krypten des Darms..... | 69 |
| Abbildung 27: Zelluläre Lokalisation von F4/80 und MMP-9. | 69 |
| Abbildung 28: Immunhistochemische Darstellung von CD45 und MAP im murinen Kolon..... | 70 |
| Abbildung 29: Immunhistochemische Darstellung von MAP- und CD45-positiver Zellen. | 71 |
| Abbildung 30: Lokalisation von intrazellulärer MAP-Kolonien und MMP-9-positiven Zellen. | 72 |
| Abbildung 31: Immunhistologische Darstellung von MAP und MMP-9- sowie CD45 positiven Zellen. | 73 |

9. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Gruppeneinteilung der MMPs | 19 |
| Tabelle 2: Übersicht der humanen Matrix-Metalloproteinasen..... | 21 |
| Tabelle 3: Herstellung des Reaktionsmix für die Synthese der cDNA und Programm für den Thermocycler (eigene Darstellung) | 39 |
| Tabelle 4: Mastermix für PCR..... | 41 |
| Tabelle 5: Programmablauf der Real-time PCR | 41 |
| Tabelle 6: Verwendete Primer, Sequenzen und Annealingtemperaturen | 43 |
| Tabelle 7: Übersicht über die bei den Färbungen verwendete Antikörper und Substanzen..... | 48 |
| Tabelle 8: Übersicht zur Genexpression der Zytokine und MMPs nach MAP-Exposition. | 55 |
| Tabelle 9: Übersicht zur Genexpression der Zytokine und MMPs nach intraperitonealer MAP-Infektion..... | 67 |

10. Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|------------------|---|---------------|--|
| °C | Grad Celsius | MAP | Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis |
| Abb. | Abbildung | max. | maximal |
| AK | Antikörper | mg | milligramm |
| APC | Adenomatosis Polyposis Coli | MHC | <i>major histocompatibility complex</i> |
| APS | Ammoniumpersulfat | Min. | Minute |
| Aqua dest | destilliertes Wasser | ml | milliliter |
| AT | annealing temperature | mmol | millimol |
| bp | Basenpaare | MMP | Matrix Metalloproteinase |
| bzw. | beziehungsweise | mRNA | messenger RNA |
| ca. | circa | MTB | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| Cat. | Katalog | MT-MMP | membrane type matrix metalloproteinase |
| CD | Crohn's disease = Morbus Crohn | MyD88 | myeloid differentiation primary response protein 88 |
| cDNA | complementary DNA | NFκβ | nuclear factor 'kappa-light-chain- enhancer' of activated B-cells |
| CED | Chronisch entzündliche Darmerkrankung | ng | Nanogramm |
| cm | Zentimeter | NIK | NFκB-inducing-Kinase (NIK) |
| CpG | cytosin- und guaninreiche DANN | nm | Nanometer |
| d3 | 3 Tage | NOD2 | Nucleotide oligodimerisation domain 2 |
| d21 | 21 Tage | NTC | no template control |
| d.h. | das heißt | OD | Optische Dichte |
| dest. | destilliert | P | Signifikanzlevel |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure | PAA | Polyacrylamid |
| DNase | Desoxyribonuklease | PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| ELISA | Enzyme linked immuno sorbent assay | PAMP | Pathogen associated molecular patterns |
| et al. | et alii | PBS | Phosphat buffered saline = Phosphat gepufferte Kochsalzlsg |
| EZM | extrazelluläre Matrix | PCR | Polymerase Chain Reaction |
| Fa. | Firma | PIM | Phosphatidylinositolmannosid |
| fw | forward | PRR | <i>pattern-recognition receptors</i> |
| g | Gramm | rev | reverse |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3- Phosphatdehydrogenase | RNA | Ribonukleinsäure |
| h | hour= Stunde | RNase | Ribonuklease |
| IBD | Inflammatory bowl disease = entzündlichen Darmerkrankungen | RT-PCR | Real-Time Polymerase chain reaction |
| IFN-γ | Interferon gamma | S | Standardabweichung |
| Ig | Immunglobulin | SDS | Sodium Dodecyl Sulfate |
| IGF | Insulin like growth factor | sec. | Sekunde |
| IL | Interleukin | SEM | Standard Error of the Mean = Standardfehler des Mittelwertes |
| IS | Insertionselement | Tab. | Tabelle |
| JNK | c-JUN N-terminal kinase | TAE | Tris-Acetate-EDTA-Puffer |
| Kap. | Kapitel | TB | Tuberkulose |
| Konz | Konzentration | TEMED | Tetramethyläthylendiamin |
| l | Liter | TGF | transforming growth factor |
| LAM | Lipoarabinomannan | | |
| LM | Lipomannan | | |
| LPS | Lipopolysaccharide | | |
| MAA | <i>Mycobacterium avium avium</i> | | |
| MAC | <i>Mycobacterium avium</i> Komplex | | |

TIMP Tissue inhibitor of
metalloproteinases
TLR Toll-like-Rezeptoren
TNF tumor necrosis factor
TRIS Tris(Hydroxy)aminomethan
u.a. unter anderem
UC ulcerative colitis = Colitis ulcerosa
WHO Weltgesundheitsorganisation
z. B. zum Beispiel
z. T. zum Teil

11. Literatur

1. WHO. Tuberculosis;
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/who104/en/print.html>. 2016. 22-3-2016.
Ref Type: Online Source
2. Dalziel TK. Thomas Kennedy Dalziel 1861-1924. Chronic interstitial enteritis. Dis Colon Rectum 32: 1076-8, 1989.
3. Chacon O, Bermudez LE, Barletta RG. Johne's disease, inflammatory bowel disease, and Mycobacterium paratuberculosis. Annu Rev Microbiol 58: 329-63, 2004.
4. Thorel MF, Krichevsky M, Levy-Frebault VV. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of Mycobacterium avium, and description of Mycobacterium avium subsp. avium subsp. nov., Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis subsp. nov., and Mycobacterium avium subsp. silvaticum subsp. nov. Int J Syst Bacteriol 40: 254-60, 1990.
5. Shinnick TM, Good RC. Mycobacterial taxonomy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 13: 884-901, 1994.
6. Over K, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. Current perspectives on Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis, Johne's disease, and Crohn's disease: a review. Crit Rev Microbiol 37: 141-56, 2011.
7. Inderlied CB, Kemper CA, Bermudez LE. The Mycobacterium avium complex. Clin Microbiol Rev 6: 266-310, 1993.
8. Legrand E, Goh KS, Sola C, Rastogi N. Description of a novel Mycobacterium simiae allelic variant isolated from Caribbean AIDS patients by PCR-restriction enzyme analysis and sequencing of hsp65 gene. Mol Cell Probes 14: 355-63, 2000.
9. Horsburgh CR, Jr. Mycobacterium avium complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med 324: 1332-8, 1991.
10. Tell LA, Woods L, Cromie RL. Mycobacteriosis in birds. Rev Sci Tech 20: 180-203, 2001.
11. Cocito C, Gilot P, Coene M, de KM, Poupart P, Vannuffel P. Paratuberculosis. Clin Microbiol Rev 7: 328-45, 1994.
12. Manning EJ, Collins MT. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: pathogen, pathogenesis and diagnosis. Rev Sci Tech 20: 133-50, 2001.
13. Hahn KSS. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer Verlag, Heidelberg, 2009.
14. Briken V, Porcelli SA, Besra GS, Kremer L. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. Mol Microbiol 53: 391-403, 2004.

15. Zhang Y, Broser M, Rom WN. Activation of the interleukin 6 gene by Mycobacterium tuberculosis or lipopolysaccharide is mediated by nuclear factors NF-IL6 and NF-kappa B. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 2225-9, 1994.
16. Barry CE, III. Interpreting cell wall 'virulence factors' of Mycobacterium tuberculosis. Trends Microbiol 9: 237-41, 2001.
17. Conn HJ, Dimmick I. Soil Bacteria Similar in Morphology to Mycobacterium and Corynebacterium. J Bacteriol 54: 291-303, 1947.
18. Hett EC, Rubin EJ. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. Microbiol Mol Biol Rev 72: 126-56, table, 2008.
19. Nguyen L, Pieters J. Mycobacterial subversion of chemotherapeutic reagents and host defense tactics: challenges in tuberculosis drug development. Annu Rev Pharmacol Toxicol 49: 427-53, 2009.
20. Besra GS, Brennan PJ. The mycobacterial cell wall: biosynthesis of arabinogalactan and lipoarabinomannan. Biochem Soc Trans 25: 845-50, 1997.
21. Nigou J, Gilleron M, Puzo G. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. Biochimie 85: 153-66, 2003.
22. Nigou J, Gilleron M, Rojas M, Garcia LF, Thurnher M, Puzo G. Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response. Microbes Infect 4: 945-53, 2002.
23. Ellis RC, Zabrowarny LA. Safer staining method for acid fast bacilli. J Clin Pathol 46: 559-60, 1993.
24. Van DA, Hossain MA, Gumusboga M, Rieder HL. Ziehl-Neelsen staining: theory and practice. Int J Tuberc Lung Dis 12: 108-10, 2008.
25. Ulrichs T, Lefmann M, Reich M, Morawietz L, Roth A, Brinkmann V, Kosmiadi GA, Seiler P, Aichele P, Hahn H, Krenn V, Gobel UB, Kaufmann SH. Modified immunohistological staining allows detection of Ziehl-Neelsen-negative Mycobacterium tuberculosis organisms and their precise localization in human tissue. J Pathol 205: 633-40, 2005.
26. Chen P, Shi M, Feng GD, Liu JY, Wang BJ, Shi XD, Ma L, Liu XD, Yang YN, Dai W, Liu TT, He Y, Li JG, Hao XK, Zhao G. A highly efficient Ziehl-Neelsen stain: identifying de novo intracellular Mycobacterium tuberculosis and improving detection of extracellular M. tuberculosis in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 50: 1166-70, 2012.
27. Meissner G, Schroder KH, Amadio GE, Anz W, Chaparas S, Engel HW, Jenkins PA, Kappler W, Kleeberg HH, Kubala E, Kubin M, Lauterbach D, Lind A, Magnusson M, Mikova Z, Pattyn SR, Schaefer WB, Stanford JL, Tsukamura M, Wayne LG, Willers I, Wolinsky E. A co-operative numerical analysis of nontuberculous and nonphotochromogenic slowly growing mycobacteria. J Gen Microbiol 83: 207-35, 1974.
28. Uchiya K, Takahashi H, Yagi T, Moriyama M, Inagaki T, Ichikawa K, Nakagawa T, Nikai T, Ogawa K. Comparative genome analysis of Mycobacterium avium revealed genetic diversity in strains that cause pulmonary and disseminated disease. PLoS One 8: e71831, 2013.

29. Turenne CY, Wallace R, Jr., Behr MA. *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. *Clin Microbiol Rev* 20: 205-29, 2007.
30. Grant IR. Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. *J Appl Microbiol* 98: 1282-93, 2005.
31. Zurbrick BG, Czuprynski CJ. Ingestion and intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* within bovine blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* 55: 1588-93, 1987.
32. Rowe MT, Grant IR. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics. *Lett Appl Microbiol* 42: 305-11, 2006.
33. Vary PH, Andersen PR, Green E, Hermon-Taylor J, McFadden JJ. Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J Clin Microbiol* 28: 933-7, 1990.
34. Bull TJ, McMinn EJ, Sidi-Boumedine K, Skull A, Durkin D, Neild P, Rhodes G, Pickup R, Hermon-Taylor J. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J Clin Microbiol* 41: 2915-23, 2003.
35. Autschbach F, Eisold S, Hinz U, Zinser S, Linnebacher M, Giese T, Loffler T, Buchler MW, Schmidt J. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut* 54: 944-9, 2005.
36. Tuci A, Tonon F, Castellani L, Sartini A, Roda G, Marocchi M, Caponi A, Munarini A, Rosati G, Ugolini G, Fuccio L, Scagliarini M, Bazzoli F, Belluzzi A. Fecal detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* using the IS900 DNA sequence in Crohn's disease and ulcerative colitis patients and healthy subjects. *Dig Dis Sci* 56: 2957-62, 2011.
37. Sidoti F, Banche G, Astegiano S, Allizond V, Cuffini AM, Bergallo M. Validation and standardization of IS900 and F57 real-time quantitative PCR assays for the specific detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Can J Microbiol* 57: 347-54, 2011.
38. Turenne CY, Semret M, Cousins DV, Collins DM, Behr MA. Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. *J Clin Microbiol* 44: 433-40, 2006.
39. Waddell LA, Rajic A, Sargeant J, Harris J, Amezcua R, Downey L, Read S, McEwen SA. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*: a systematic review. *Can J Public Health* 99: 145-55, 2008.
40. Frothingham L. AN APPARENTLY NEW FORM OF TUBERCULOSIS. *J Boston Soc Med Sci* 1: 1-2, 1896.
41. Harris NB, Barletta RG. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev* 14: 489-512, 2001.
42. McClure HM, Chiodini RJ, Anderson DC, Swenson RB, Thayer WR, Coutu JA. *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a colony of stump-tail macaques (*Macaca arctoides*). *J Infect Dis* 155: 1011-9, 1987.

43. Lepper AW, Wilks CR, Kotiw M, Whitehead JT, Swart KS. Sequential bacteriological observations in relation to cell-mediated and humoral antibody responses of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* and maintained on normal or high iron intake. *Aust Vet J* 66: 50-5, 1989.
44. Nielsen SS, Grohn YT, Enevoldsen C. Variation of the milk antibody response to paratuberculosis in naturally infected dairy cows. *J Dairy Sci* 85: 2795-802, 2002.
45. Whitlock RH, Buergelt C. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12: 345-56, 1996.
46. Clarke CJ. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Pathol* 116: 217-61, 1997.
47. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272: 50-3, 1996.
48. Momotani E, Whipple DL, Thiermann AB, Cheville NF. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet Pathol* 25: 131-7, 1988.
49. Zhao BY, Czuprynski CJ, Collins MT. Intracellular fate of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in monocytes from normal and infected, interferon-responsive cows as determined by a radiometric method. *Can J Vet Res* 63: 56-61, 1999.
50. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Lipoproteins take their toll on the host. *Curr Biol* 9: R879-R882, 1999.
51. Sigurethardottir OG, Valheim M, Press CM. Establishment of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in the intestine of ruminants. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 819-34, 2004.
52. Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 168: 4620-7, 2002.
53. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 19: 93-129, 2001.
54. Zurbrick BG, Follett DM, Czuprynski CJ. Cytokine regulation of the intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine monocytes. *Infect Immun* 56: 1692-7, 1988.
55. Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)* 84: 93-101, 2004.
56. Immunopaedia. Immunopaedia.org 2010;
<http://www.immunopaedia.org.za/index.php?id=389>. 2016. 2-4-2016.
Ref Type: Online Source
57. Henderson B, Poole S, Wilson M. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol Rev* 60: 316-41, 1996.

58. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 83: 91-7, 2003.
59. Doyle SL, O'Neill LA. Toll-like receptors: from the discovery of NF κ B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol* 72: 1102-13, 2006.
60. Ulrichs T, Kaufmann SH. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol* 208: 261-9, 2006.
61. Nguyen L, Pieters J. The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Trends Cell Biol* 15: 269-76, 2005.
62. Valentin-Weigand P. Intracellular invasion and persistence: survival strategies of *Streptococcus suis* and *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 117: 459-63, 2004.
63. Chiodini RJ. Immunology: resistance to paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12: 313-43, 1996.
64. Valentin-Weigand P, Goethe R. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. *Microbes Infect* 1: 1121-7, 1999.
65. Coussens PM. Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle. *Infect Immun* 72: 3089-96, 2004.
66. Buergelt CD, Hall C, McEntee K, Duncan JR. Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet Pathol* 15: 196-207, 1978.
67. Stabel JR. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 77: 465-73, 2000.
68. Coussens PM. *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Anim Health Res Rev* 2: 141-61, 2001.
69. Co DO, Hogan LH, Kim SI, Sandor M. Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship. *Clin Immunol* 113: 130-6, 2004.
70. Hingley-Wilson SM, Sambandamurthy VK, Jacobs WR, Jr. Survival perspectives from the world's most successful pathogen, *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Immunol* 4: 949-55, 2003.
71. Wayne LG, Sohaskey CD. Nonreplicating persistence of mycobacterium tuberculosis. *Annu Rev Microbiol* 55: 139-63, 2001.
72. Pieters J. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect* 3: 249-55, 2001.
73. Clemens DL, Horwitz MA. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med* 181: 257-70, 1995.
74. Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 120: 213-32, 2004.

75. Little D, Alzuherri HM, Clarke CJ. Phenotypic characterisation of intestinal lymphocytes in ovine paratuberculosis by immunohistochemistry. *Vet Immunol Immunopathol* 55: 175-87, 1996.
76. Chiodini RJ, Davis WC. The cellular immunology of bovine paratuberculosis: immunity may be regulated by CD4+ helper and CD8+ immunoregulatory T lymphocytes which down-regulate gamma/delta+ T-cell cytotoxicity. *Microb Pathog* 14: 355-67, 1993.
77. Florido M, Goncalves AS, Silva RA, Ehlers S, Cooper AM, Appelberg R. Resistance of virulent *Mycobacterium avium* to gamma interferon-mediated antimicrobial activity suggests additional signals for induction of mycobacteriostasis. *Infect Immun* 67: 3610-8, 1999.
78. Adams JL, Czuprynski CJ. Mycobacterial cell wall components induce the production of TNF-alpha, IL-1, and IL-6 by bovine monocytes and the murine macrophage cell line RAW 264.7. *Microb Pathog* 16: 401-11, 1994.
79. Stabel JR. Cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res* 61: 754-60, 2000.
80. Clancy R, Ren Z, Turton J, Pang G, Wettstein A. Molecular evidence for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) in Crohn's disease correlates with enhanced TNF-alpha secretion. *Dig Liver Dis* 39: 445-51, 2007.
81. Sibartie S, Scully P, Keohane J, O'Neill S, O'Mahony J, O'Hanlon D, Kirwan WO, O'Mahony L, Shanahan F. *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis (MAP) as a modifying factor in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 16: 296-304, 2010.
82. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mak TW, Bloom BR. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 2: 561-72, 1995.
83. Jacobs M, Togbe D, Fremond C, Samarina A, Allie N, Botha T, Carlos D, Parida SK, Grivennikov S, Nedospasov S, Monteiro A, Le BM, Quesniaux V, Ryffel B. Tumor necrosis factor is critical to control tuberculosis infection. *Microbes Infect* 9: 623-8, 2007.
84. Kollias G, Douni E, Kassiotis G, Kontoyiannis D. The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Ann Rheum Dis* 58 Suppl 1: I32-I39, 1999.
85. Zhang Q, Hui W, Litherland GJ, Barter MJ, Davidson R, Darrah C, Donell ST, Clark IM, Cawston TE, Robinson JH, Rowan AD, Young DA. Differential Toll-like receptor-dependent collagenase expression in chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 67: 1633-41, 2008.
86. Feller M, Huwiler K, Stephan R, Altpeter E, Shang A, Furrer H, Pfyffer GE, Jemmi T, Baumgartner A, Egger M. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 7: 607-13, 2007.

87. Mendoza JL, Lana R, az-Rubio M. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and its relationship with Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 15: 417-22, 2009.
88. Rath T, Roderfeld M, Blocher S, Rhode A, Basler T, Akineden O, Abdulmawjood A, Halwe JM, Goethe R, Bulte M, Roeb E. Presence of intestinal *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) DNA is not associated with altered MMP expression in ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol* 11: 34, 2011.
89. Fujita H, Eishi Y, Ishige I, Saitoh K, Takizawa T, Arima T, Koike M. Quantitative analysis of bacterial DNA from *Mycobacteria* spp., *Bacteroides vulgatus*, and *Escherichia coli* in tissue samples from patients with inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol* 37: 509-16, 2002.
90. Rowbotham DS, Mapstone NP, Trejdosiewicz LK, Howdle PD, Quirke P. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA not detected in Crohn's disease tissue by fluorescent polymerase chain reaction. *Gut* 37: 660-7, 1995.
91. Clarkston WK, Presti ME, Petersen PF, Zachary PE, Jr., Fan WX, Leonardi CL, Vernava AM, III, Longo WE, Kreeger JM. Role of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease: a prospective, controlled study using polymerase chain reaction. *Dis Colon Rectum* 41: 195-9, 1998.
92. Abubakar I, Myhill D, Aliyu SH, Hunter PR. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 14: 401-10, 2008.
93. Begg DJ, Whittington RJ. Experimental animal infection models for Johne's disease, an infectious enteropathy caused by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Vet J* 176: 129-45, 2008.
94. Hines ME, Stabel JR, Sweeney RW, Griffin F, Talaat AM, Bakker D, Benedictus G, Davis WC, de Lisle GW, Gardner IA, Juste RA, Kapur V, Koets A, McNair J, Pruitt G, Whitlock RH. Experimental challenge models for Johne's disease: a review and proposed international guidelines. *Vet Microbiol* 122: 197-222, 2007.
95. Veazey RS, Horohov DW, Krahenbuhl JL, Taylor HW, Oliver JL, III, Snider TG, III. Comparison of the resistance of C57BL/6 and C3H/He mice to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 47: 79-87, 1995.
96. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* 5: 1461-71, 1993.
97. Mutwiri GK, Rosendal S, Kosecka U, Yager JA, Perdue M, Snider D, Butler DG. Adoptive transfer of BALb/c mouse splenocytes reduces lesion severity and induces intestinal pathophysiologic changes in the *Mycobacterium avium* Subspecies paratuberculosis beige/scid mouse model. *Comp Med* 52: 332-41, 2002.
98. Leithauser F, Krajina T, Trobonjaca Z, Reimann J. Early events in the pathogenesis of a murine transfer colitis. *Pathobiology* 70: 156-63, 2002.

99. Trowbridge IS, Thomas ML. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 12: 85-116, 1994.
100. Asseman C, Read S, Powrie F. Colitogenic Th1 cells are present in the antigen-experienced T cell pool in normal mice: control by CD4+ regulatory T cells and IL-10. *J Immunol* 171: 971-8, 2003.
101. Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248: 1517-23, 1990.
102. Marks DJ, Segal AW. Innate immunity in inflammatory bowel disease: a disease hypothesis. *J Pathol* 214: 260-6, 2008.
103. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347: 417-29, 2002.
104. CROHN BB, GINZBURG L, OPPENHEIMER GD. Regional ileitis; a pathologic and clinical entity. *Am J Med* 13: 583-90, 1952.
105. Ghosh S, Shand A, Ferguson A. Ulcerative colitis. *BMJ* 320: 1119-23, 2000.
106. Rao SS, Holdsworth CD, Read NW. Symptoms and stool patterns in patients with ulcerative colitis. *Gut* 29: 342-5, 1988.
107. Halwe JM. Expression von Matrix-Metalloproteinasen bei Colitis ulcerosa: Kohortenstudie des Universitätsklinikums Stavanger, Norwegen. 2010. Dissertation Justus-liebig Universität Gießen.
Ref Type: Thesis/Dissertation
108. Kim M, Jang HJ. The role of small bowel endoscopy in small bowel Crohn's disease: when and how? *Intest Res* 14: 211-7, 2016.
109. Shanahan F. Crohn's disease. *Lancet* 359: 62-9, 2002.
110. Sibartie S, Scully P, Keohane J, O'Neill S, O'Mahony J, O'Hanlon D, Kirwan WO, O'Mahony L, Shanahan F. *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (MAP) as a modifying factor in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 16: 296-304, 2010.
111. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 312: 95-6, 1996.
112. Mathew CG, Lewis CM. Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1: R161-R168, 2004.
113. Mudter J, Neurath MF. Mucosal T cells: mediators or guardians of inflammatory bowel disease? *Curr Opin Gastroenterol* 19: 343-9, 2003.
114. Ryffel B, Fremont C, Jacobs M, Parida S, Botha T, Schnyder B, Quesniaux V. Innate immunity to mycobacterial infection in mice: critical role for toll-like receptors. *Tuberculosis (Edinb)* 85: 395-405, 2005.
115. Economou M, Pappas G. New global map of Crohn's disease: Genetic, environmental, and socioeconomic correlations. *Inflamm Bowel Dis* 14: 709-20, 2008.

116. Lakatos PL. Environmental factors affecting inflammatory bowel disease: have we made progress? *Dig Dis* 27: 215-25, 2009.
117. Momotani E, Romona NM, Yoshihara K, Momotani Y, Hori M, Ozaki H, Eda S, Ikegami M. Molecular pathogenesis of bovine paratuberculosis and human inflammatory bowel diseases. *Vet Immunol Immunopathol* 148: 55-68, 2012.
118. Neuman MG, Nanau RM. Inflammatory bowel disease: role of diet, microbiota, life style. *Transl Res* 160: 29-44, 2012.
119. Podolsky DK. The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16: 933-43, 2002.
120. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology* 146: 1489-99, 2014.
121. Greenstein RJ. Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *Lancet Infect Dis* 3: 507-14, 2003.
122. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 361: 2066-78, 2009.
123. Baumgart DC. The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int* 106: 123-33, 2009.
124. El-Zaatari FA, Osato MS, Graham DY. Etiology of Crohn's disease: the role of *Mycobacterium avium* paratuberculosis. *Trends Mol Med* 7: 247-52, 2001.
125. Dalziel TK. Thomas Kennedy Dalziel 1861-1924. Chronic interstitial enteritis. *Dis Colon Rectum* 32: 1076-8, 1989.
126. Chiodini RJ. Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin Microbiol Rev* 2: 90-117, 1989.
127. Francois B, Krishnamoorthy R, Elion J. Comparative study of *Mycobacterium* paratuberculosis strains isolated from Crohn's disease and Johne's disease using restriction fragment length polymorphism and arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* 118: 227-33, 1997.
128. Abubakar I, Myhill D, Aliyu SH, Hunter PR. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 14: 401-10, 2008.
129. Behr MA, Kapur V. The evidence for *Mycobacterium* paratuberculosis in Crohn's disease. *Curr Opin Gastroenterol* 24: 17-21, 2008.
130. Kirkwood CD, Wagner J, Boniface K, Vaughan J, Michalski WP, Catto-Smith AG, Cameron DJ, Bishop RF. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in children with early-onset Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 15: 1643-55, 2009.
131. Rosenfeld G, Bressler B. *Mycobacterium avium* paratuberculosis and the etiology of Crohn's disease: a review of the controversy from the clinician's perspective. *Can J Gastroenterol* 24: 619-24, 2010.

132. Saleh A NPGGPCRMJFVM. Culture of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. *The Lancet* 364: 1039-44, 2004.
133. Klee. Paratuberkulose (Johnesche Krankheit). In: Gründer H.D., Stüber M., Dirksen G., eds. *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. Berlin: Parey Verlag, p. 586-591, 2004.
134. Chamberlin WM, Naser SA. Integrating theories of the etiology of Crohn's disease. On the etiology of Crohn's disease: questioning the hypotheses. *Med Sci Monit* 12: RA27-RA33, 2006.
135. Chiodini RJ, Dowd SE, Davis B, Galandiuk S, Chamberlin WM, Kuenstner JT, McCallum RW, Zhang J. Crohn's disease may be differentiated into 2 distinct biotypes based on the detection of bacterial genomic sequences and virulence genes within submucosal tissues. *J Clin Gastroenterol* 47: 612-20, 2013.
136. Messina JP, Gilkeson GS, Pisetsky DS. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J Immunol* 147: 1759-64, 1991.
137. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546-9, 1995.
138. Hof H. DR. Rezeptoren auf Zellen des Immunsystems. In: *Medizinische Mikrobiologie*; 3.Auflage. Stuttgart, New York: p. 65-75, 2005.
139. Sato Y, Goto Y, Narita N, Hoon DS. Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron* 2 Suppl 1: 205-14, 2009.
140. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17: 1-14, 2005.
141. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 5: 190-8, 2004.
142. Quiding-Jarbrink M, Smith DA, Bancroft GJ. Production of matrix metalloproteinases in response to mycobacterial infection. *Infect Immun* 69: 5661-70, 2001.
143. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801, 2006.
144. Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15: 396-401, 2003.
145. Salgame P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection. *Curr Opin Immunol* 17: 374-80, 2005.
146. Bulut Y, Faure E, Thomas L, Equils O, Arditi M. Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and Borrelia burgdorferi outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J Immunol* 167: 987-94, 2001.

147. Krutzik SR, Modlin RL. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. *Semin Immunol* 16: 35-41, 2004.
148. Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and Type I interferons. *J Biol Chem* 282: 15319-23, 2007.
149. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69: 562-73, 2006.
150. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 197-250, 1993.
151. Woessner JF, Jr. The family of matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 732: 11-21, 1994.
152. Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477: 267-83, 2000.
153. Murphy G, Willenbrock F. Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases. *Methods Enzymol* 248: 496-510, 1995.
154. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 4: 617-29, 2004.
155. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516, 2001.
156. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 221-33, 2007.
157. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74: 111-22, 1997.
158. Rath T, Roderfeld M, Graf J, Roeb E. [Matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease - from basic research to clinical significance]. *Z Gastroenterol* 47: 758-69, 2009.
159. Roeb E, Matern S. [Matrix metalloproteinases and colorectal cancer]. *Med Klin (Munich)* 98: 763-70, 2003.
160. Somerville RP, Oblander SA, Apte SS. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol* 4: 216, 2003.
161. Roeb E, Dietrich CG, Winograd R, Arndt M, Breuer B, Fass J, Schumpelick V, Matern S. Activity and cellular origin of gelatinases in patients with colon and rectal carcinoma differential activity of matrix metalloproteinase-9. *Cancer* 92: 2680-91, 2001.
162. Roeb E, Matern S. [Matrix metalloproteinases: Promoters of tumor invasion and metastasis - A review with focus on gastrointestinal tumors]. *Z Gastroenterol* 39: 807-13, 2001.

163. Puente XS, Pendas AM, Llano E, Velasco G, Lopez-Otin C. Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res* 56: 944-9, 1996.
164. Vallee BL, Auld DS. Active-site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 220-4, 1990.
165. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 378: 151-60, 1997.
166. Pourmotabbed T. Relation between substrate specificity and domain structure of 92-kDa type IV collagenase. *Ann N Y Acad Sci* 732: 372-4, 1994.
167. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol* 46: 955-75, 2007.
168. Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K. Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci* 55: 639-52, 1999.
169. Li J, Brick P, O'Hare MC, Skarzynski T, Lloyd LF, Curry VA, Clark IM, Bigg HF, Hazleman BL, Cawston TE, . Structure of full-length porcine synovial collagenase reveals a C-terminal domain containing a calcium-linked, four-bladed beta-propeller. *Structure* 3: 541-9, 1995.
170. Banyai L, Tordai H, Pathty L. Structure and domain-domain interactions of the gelatin binding site of human 72-kilodalton type IV collagenase (gelatinase A, matrix metalloproteinase 2). *J Biol Chem* 271: 12003-8, 1996.
171. Ries C, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376: 345-55, 1995.
172. Deschamps AM, Spinale FG. Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc Res* 69: 666-76, 2006.
173. Lijnen HR. Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry (Mosc)* 67: 92-8, 2002.
174. Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Siple J, Nagase H, French DL, Quigley JP. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* 274: 13066-76, 1999.
175. Moilanen M, Sorsa T, Stenman M, Nyberg P, Lindy O, Vesterinen J, Paju A, Konttinen YT, Stenman UH, Salo T. Tumor-associated trypsinogen-2 (trypsinogen-2) activates procollagenases (MMP-1, -8, -13) and stromelysin-1 (MMP-3) and degrades type I collagen. *Biochemistry* 42: 5414-20, 2003.
176. Roeb E, Graeve L, Hoffmann R, Decker K, Edwards DR, Heinrich PC. Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 gene expression by cytokines and dexamethasone in rat hepatocyte primary cultures. *Hepatology* 18: 1437-42, 1993.

177. Murphy G, Knauper V, Cowell S, Hembry R, Stanton H, Butler G, Freije J, Pendas AM, Lopez-Otin C. Evaluation of some newer matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 878: 25-39, 1999.
178. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 3: 521-33, 2003.
179. Pender SL, Tickle SP, Docherty AJ, Howie D, Wathen NC, MacDonald TT. A major role for matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. *J Immunol* 158: 1582-90, 1997.
180. von LB, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 47: 63-73, 2000.
181. Arihiro S, Ohtani H, Hiwatashi N, Torii A, Sorsa T, Nagura H. Vascular smooth muscle cells and pericytes express MMP-1, MMP-9, TIMP-1 and type I procollagen in inflammatory bowel disease. *Histopathology* 39: 50-9, 2001.
182. Baugh MD, Perry MJ, Hollander AP, Davies DR, Cross SS, Lobo AJ, Taylor CJ, Evans GS. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 117: 814-22, 1999.
183. Saarialho-Kere UK. Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers. *Arch Dermatol Res* 290 Suppl: S47-S54, 1998.
184. Kirkegaard T, Hansen A, Bruun E, Brynskov J. Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease. *Gut* 53: 701-9, 2004.
185. Castaneda FE, Walia B, Vijay-Kumar M, Patel NR, Roser S, Kolachala VL, Rojas M, Wang L, Oprea G, Garg P, Gewirtz AT, Roman J, Merlin D, Sitaraman SV. Targeted deletion of metalloproteinase 9 attenuates experimental colitis in mice: central role of epithelial-derived MMP. *Gastroenterology* 129: 1991-2008, 2005.
186. Di SP, di Mola FF, Artese L, Rossi C, Mascetta G, Pernthaler H, Innocenti P. Beneficial effects of Batimastat (BB-94), a matrix metalloproteinase inhibitor, in rat experimental colitis. *Digestion* 63: 234-9, 2001.
187. Sykes AP, Bhogal R, Brampton C, Chander C, Whelan C, Parsons ME, Bird J. The effect of an inhibitor of matrix metalloproteinases on colonic inflammation in a trinitrobenzenesulphonic acid rat model of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 13: 1535-42, 1999.
188. Sykes AP, Bhogal R, Brampton C, Chander C, Whelan C, Parsons ME, Bird J. The effect of an inhibitor of matrix metalloproteinases on colonic inflammation in a trinitrobenzenesulphonic acid rat model of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 13: 1535-42, 1999.
189. Eccles SA, Box GM, Court WJ, Bone EA, Thomas W, Brown PD. Control of lymphatic and hematogenous metastasis of a rat mammary carcinoma by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94). *Cancer Res* 56: 2815-22, 1996.

190. Knox JD, Bretton L, Lynch T, Bowden GT, Nagle RB. Synthetic matrix metalloproteinase inhibitor, BB-94, inhibits the invasion of neoplastic human prostate cells in a mouse model. *Prostate* 35: 248-54, 1998.
191. Bramhall SR, Hallissey MT, Whiting J, Scholefield J, Tierney G, Stuart RC, Hawkins RE, McCulloch P, Maughan T, Brown PD, Baillet M, Fielding JW. Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomised trial. *Br J Cancer* 86: 1864-70, 2002.
192. Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med* 31: 34-45, 1999.
193. Brown PD. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Breast Cancer Res Treat* 52: 125-36, 1998.
194. Bramhall SR, Hallissey MT, Whiting J, Scholefield J, Tierney G, Stuart RC, Hawkins RE, McCulloch P, Maughan T, Brown PD, Baillet M, Fielding JW. Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomised trial. *Br J Cancer* 86: 1864-70, 2002.
195. Macaulay VM, O'Byrne KJ, Saunders MP, Braybrooke JP, Long L, Gleeson F, Mason CS, Harris AL, Brown P, Talbot DC. Phase I study of intrapleural batimastat (BB-94), a matrix metalloproteinase inhibitor, in the treatment of malignant pleural effusions. *Clin Cancer Res* 5: 513-20, 1999.
196. Fife RS, Rougraff BT, Proctor C, Sledge GW, Jr. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by doxycycline in cultured human osteosarcoma cells. *J Lab Clin Med* 130: 530-4, 1997.
197. Salmela MT, Pender SL, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, MacDonald TT, Saarialho-Kere U. Collagenase-1 (MMP-1), matrilysin-1 (MMP-7), and stromelysin-2 (MMP-10) are expressed by migrating enterocytes during intestinal wound healing. *Scand J Gastroenterol* 39: 1095-104, 2004.
198. Coussens A, Timms PM, Boucher BJ, Venton TR, Ashcroft AT, Skolimowska KH, Newton SM, Wilkinson KA, Davidson RN, Griffiths CJ, Wilkinson RJ, Martineau AR. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits matrix metalloproteinases induced by *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology* 127: 539-48, 2009.
199. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92: 827-39, 2003.
200. Ravi A, Garg P, Sitaraman SV. Matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease: boon or a bane? *Inflamm Bowel Dis* 13: 97-107, 2007.
201. Parks WC. Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair Regen* 7: 423-32, 1999.
202. Matsuno K, Adachi Y, Yamamoto H, Goto A, Arimura Y, Endo T, Itoh F, Imai K. The expression of matrix metalloproteinase matrilysin indicates the degree of inflammation in ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 38: 348-54, 2003.
203. Rath T, Roderfeld M, Graf J, Wagner S, Vehr AK, Dietrich C, Geier A, Roeb E. Enhanced expression of MMP-7 and MMP-13 in inflammatory bowel disease: a precancerous potential? *Inflamm Bowel Dis* 12: 1025-35, 2006.

204. Wernicke AK, Churin Y, Sheridan D, Windhorst A, Tschuschner A, Gattenlohner S, Roderfeld M, Roeb E. Matrix metalloproteinase-13 refines pathological staging of precancerous colorectal lesions. *Oncotarget* 2016.
205. Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP, Ayabe T, Lopez-Boado YS, Stratman JL, Hultgren SJ, Matrisian LM, Parks WC. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 286: 113-7, 1999.
206. Murphy G, Ward R, Hembry RM, Reynolds JJ, Kuhn K, Tryggvason K. Characterization of gelatinase from pig polymorphonuclear leucocytes. A metalloproteinase resembling tumour type IV collagenase. *Biochem J* 258: 463-72, 1989.
207. Leeman MF, McKay JA, Murray GI. Matrix metalloproteinase 13 activity is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 55: 758-62, 2002.
208. Chandler S, Miller KM, Clements JM, Lury J, Corkill D, Anthony DC, Adams SE, Gearing AJ. Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J Neuroimmunol* 72: 155-61, 1997.
209. Malhotra S, Newman E, Eisenberg D, Scholes J, Wieczorek R, Mignatti P, Shamamian P. Increased membrane type 1 matrix metalloproteinase expression from adenoma to colon cancer: a possible mechanism of neoplastic progression. *Dis Colon Rectum* 45: 537-43, 2002.
210. Udayakumar TS, Chen ML, Bair EL, Von B, Cress AE, Nagle RB, Bowden GT. Membrane type-1-matrix metalloproteinase expressed by prostate carcinoma cells cleaves human laminin-5 beta3 chain and induces cell migration. *Cancer Res* 63: 2292-9, 2003.
211. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1: 4578-85, 2011.
212. Hasegawa M, Osaka T, Tawaratsumida K, Yamazaki T, Tada H, Chen GY, Tsuneda S, Nunez G, Inohara N. Transitions in oral and intestinal microflora composition and innate immune receptor-dependent stimulation during mouse development. *Infect Immun* 78: 639-50, 2010.
213. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 5: e177, 2007.
214. Pott J, Basler T, Duerr CU, Rohde M, Goethe R, Hornef MW. Internalization-dependent recognition of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* by intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* 11: 1802-15, 2009.
215. Heinzmann J, Wilkens M, Dohmann K, Gerlach GF. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-specific mpt operon expressed in *M. bovis* BCG as vaccine candidate. *Vet Microbiol* 130: 330-7, 2008.
216. Roderfeld M, Koc A, Rath T, Blocher S, Tschuschner A, Akineden O, Fischer M, von GS, Goethe R, Eckelt E, Meens J, Bulte M, Basler T, Roeb E. Induction of matrix metalloproteinases and TLR2 and 6 in murine colon after oral exposure to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbes Infect* 14: 545-53, 2012.

217. Bargen I. Towards a murine infection model for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. 2011. Helmholtz Centre for Infection Research.
Ref Type: Thesis/Dissertation
218. Logar K, Kopinc R, Bandelj P, Staric J, Lapanje A, Ocepek M. Evaluation of combined high-efficiency DNA extraction and real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in subclinically infected dairy cattle: comparison with faecal culture, milk real-time PCR and milk ELISA. *BMC Vet Res* 8: 49, 2012.
219. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25: 402-8, 2001.
220. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45, 2001.
221. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45, 2001.
222. Roderfeld M, Weiskirchen R, Wagner S, Berres ML, Henkel C, Grotzinger J, Gressner AM, Matern S, Roeb E. Inhibition of hepatic fibrogenesis by matrix metalloproteinase-9 mutants in mice. *FASEB J* 20: 444-54, 2006.
223. Weigoldt M, Meens J, Doll K, Fritsch I, Mobius P, Goethe R, Gerlach GF. Differential proteome analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* grown in vitro and isolated from cases of clinical Johne's disease. *Microbiology* 157: 557-65, 2011.
224. Meens J, Bolotin V, Frank R, Bohmer J, Gerlach GF. Characterization of a highly immunogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoprotein Mhp366 identified by peptide-spot array. *Vet Microbiol* 142: 293-302, 2010.
225. Basu S, Pathak S, Pathak SK, Bhattacharyya A, Banerjee A, Kundu M, Basu J. *Mycobacterium avium*-induced matrix metalloproteinase-9 expression occurs in a cyclooxygenase-2-dependent manner and involves phosphorylation- and acetylation-dependent chromatin modification. *Cell Microbiol* 9: 2804-16, 2007.
226. Dezzutti CS, Swords WE, Guenther PC, Sasso DR, Wahl LM, Drummond AH, Newman GW, King CH, Quinn FD, Lal RB. Involvement of matrix metalloproteinases in human immunodeficiency virus type 1-induced replication by clinical *Mycobacterium avium* isolates. *J Infect Dis* 180: 1142-52, 1999.
227. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13766-71, 2000.
228. Plain KM, Purdie AC, Begg DJ, de SK, Whittington RJ. Toll-like receptor (TLR)6 and TLR1 differentiation in gene expression studies of Johne's disease. *Vet Immunol Immunopathol* 137: 142-8, 2010.
229. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401: 811-5, 1999.

230. Ferwerda G, Kullberg BJ, de Jong DJ, Girardin SE, Langenberg DM, van CR, Ottenhoff TH, Van der Meer JW, Netea MG. Mycobacterium paratuberculosis is recognized by Toll-like receptors and NOD2. *J Leukoc Biol* 82: 1011-8, 2007.
231. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13: 933-40, 2001.
232. Jones PH, Farver TB, Beaman B, Cetinkaya B, Morgan KL. Crohn's disease in people exposed to clinical cases of bovine paratuberculosis. *Epidemiol Infect* 134: 49-56, 2006.
233. Suwandi A, Bargaen I, Roy B, Pils MC, Krey M, Zur LS, Basler T, Rohde M, Falk CS, Hornef MW, Goethe R, Weiss S. Experimental colitis is exacerbated by concomitant infection with Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis. *Inflamm Bowel Dis* 20: 1962-71, 2014.
234. Di SA, Paccagnini D, Vidali F, Rosu V, Biancheri P, Cossu A, Zanetti S, Corazza GR, Sechi LA. Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP)-specific IS900 DNA and antibodies against MAP peptides and lysate in the blood of Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 17: 1254-5, 2011.
235. Ellingson JL, Cheville JC, Brees D, Miller JM, Cheville NF. Absence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis components from Crohn's disease intestinal biopsy tissues. *Clin Med Res* 1: 217-26, 2003.
236. Parrish NM, Radcliff RP, Brey BJ, Anderson JL, Clark DL, Jr., Koziczkowski JJ, Ko CG, Goldberg ND, Brinker DA, Carlson RA, Dick JD, Ellingson JL. Absence of mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Crohn's patients. *Inflamm Bowel Dis* 15: 558-65, 2009.
237. Bull TJ, Hermon-Taylor J, Pavlik I, I, El-Zaatari F, Tizard M. Characterization of IS900 loci in mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and development of multiplex PCR typing. *Microbiology* 146 (Pt 12): 3285, 2000.
238. Bermudez LE, Petrofsky M, Sommer S, Barletta RG. Peyer's patch-deficient mice demonstrate that Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis translocates across the mucosal barrier via both M cells and enterocytes but has inefficient dissemination. *Infect Immun* 78: 3570-7, 2010.
239. Mutwiri GK, Butler DG, Rosendal S, Yager J. Experimental infection of severe combined immunodeficient beige mice with Mycobacterium paratuberculosis of bovine origin. *Infect Immun* 60: 4074-9, 1992.
240. Koc A, Bargaen I, Suwandi A, Roderfeld M, Tschuschner A, Rath T, Gerlach GF, Hornef M, Goethe R, Weiss S, Roeb E. Systemic and Mucosal Immune Reactivity upon Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis Infection in Mice. *PLoS One* 9: e94624, 2014.
241. Mutwiri GK, Butler DG, Rosendal S, Yager J. Experimental infection of severe combined immunodeficient beige mice with Mycobacterium paratuberculosis of bovine origin. *Infect Immun* 60: 4074-9, 1992.
242. Gill CO, Saucier L, Meadus WJ. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in dairy products, meat, and drinking water. *J Food Prot* 74: 480-99, 2011.

243. Gill CO, Saucier L, Meadus WJ. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy products, meat, and drinking water. *J Food Prot* 74: 480-99, 2011.
244. Grant IR. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal-derived foods and the environment. In: Behr MACDM, ed. *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. Oxfordshire: CAB International, p. 29-39, 2010.
245. Klanicova B, Slana I, Roubal P, Pavlik I, Kralik P. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* survival during fermentation of soured milk products detected by culture and quantitative real time PCR methods. *Int J Food Microbiol* 157: 150-5, 2012.
246. Sung N, Collins MT. Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Environ Microbiol* 64: 999-1005, 1998.
247. Basler T, Goethe R. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: ein tierpathogener Erreger mit humanpathogenen Eigenschaften? Der Forschungsverbund ZooMAP stellt sich vor. 2007.
Ref Type: Online Source
248. Rath T, Roderfeld M, Halwe JM, Tschuschner A, Roeb E, Graf J. Cellular sources of MMP-7, MMP-13 and MMP-28 in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 45: 1186-96, 2010.
249. Koelink PJ, Overbeek SA, Braber S, Morgan ME, Henricks PA, Abdul RM, Verspaget HW, Wolfkamp SC, te Velde AA, Jones CW, Jackson PL, Blalock JE, Sparidans RW, Kruijtz JA, Garssen J, Folkerts G, Kraneveld AD. Collagen degradation and neutrophilic infiltration: a vicious circle in inflammatory bowel disease. *Gut* 63: 578-87, 2014.
250. Koller FL, Dozier EA, Nam KT, Swee M, Birkland TP, Parks WC, Fingleton B. Lack of MMP10 exacerbates experimental colitis and promotes development of inflammation-associated colonic dysplasia. *Lab Invest* 92: 1749-59, 2012.
251. Chang JC, Wysocki A, Tchou-Wong KM, Moskowitz N, Zhang Y, Rom WN. Effect of *Mycobacterium tuberculosis* and its components on macrophages and the release of matrix metalloproteinases. *Thorax* 51: 306-11, 1996.
252. Coussens PM, Jeffers A, Colvin C. Rapid and transient activation of gene expression in peripheral blood mononuclear cells from Johne's disease positive cows exposed to *Mycobacterium paratuberculosis* in vitro. *Microb Pathog* 36: 93-108, 2004.
253. Coussens PM, Pudrith CB, Skovgaard K, Ren X, Suchyta SP, Stabel JR, Heegaard PM. Johne's disease in cattle is associated with enhanced expression of genes encoding IL-5, GATA-3, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2, and factors promoting apoptosis in peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol* 105: 221-34, 2005.
254. Gomes MS, Sousa FS, Cordeiro JV, Silva GS, Vieira A, Appelberg R. Engagement of Toll-like receptor 2 in mouse macrophages infected with *Mycobacterium avium* induces non-oxidative and TNF-independent anti-mycobacterial activity. *Eur J Immunol* 38: 2180-9, 2008.
255. Sweet L, Schorey JS. Glycopeptidolipids from *Mycobacterium avium* promote macrophage activation in a. *J Leukoc Biol* 80: 415-23, 2006.

256. Taylor DL, Zhong L, Begg DJ, de SK, Whittington RJ. Toll-like receptor genes are differentially expressed at the sites of infection during the progression of Johne's disease in outbred sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 124: 132-51, 2008.
257. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34: 637-50, 2011.
258. Chambers MA, Whelan AO, Spallek R, Singh M, Coddeville B, Guerardel Y, Ellass E. Non-acylated *Mycobacterium bovis* glycoprotein MPB83 binds to TLR1/2 and stimulates production of matrix metalloproteinase 9. *Biochem Biophys Res Commun* 400: 403-8, 2010.
259. Kaneko M, Suzuki JI, Aoyama N, Watanabe R, Yoshida A, Shiheido Y, Izumi Y, Isobe M. Toll-like receptor-2 has a critical role in periodontal pathogen-induced myocardial fibrosis in the pressure-overloaded murine hearts. *Hypertens Res* 2016.
260. Aoyama N, Suzuki J, Ogawa M, Watanabe R, Kobayashi N, Hanatani T, Ashigaki N, Sekinishi A, Izumi Y, Isobe M. Toll-like receptor-2 plays a fundamental role in periodontal bacteria-accelerated abdominal aortic aneurysms. *Circ J* 77: 1565-73, 2013.
261. Koets AP, Eda S, Sreevatsan S. The within host dynamics of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in cattle: where time and place matter. *Vet Res* 46: 61, 2015.
262. Noss EH, Harding CV, Boom WH. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits MHC class II antigen processing in murine bone marrow macrophages. *Cell Immunol* 201: 63-74, 2000.
263. Ehlers S, Benini J, Held HD, Roeck C, Alber G, Uhlig S. Alphabeta T cell receptor-positive cells and interferon-gamma, but not inducible nitric oxide synthase, are critical for granuloma necrosis in a mouse model of mycobacteria-induced pulmonary immunopathology. *J Exp Med* 194: 1847-59, 2001.
264. Hogan LH, Heninger E, Elsner RA, Vonderheid HA, Hulseberg P, Co D, Sandor M. Requirements for CD4(+) T cell levels in acute *Mycobacterium bovis* strain bacille Calmette Guerin (BCG)-induced granulomas differ for optimal mycobacterial control versus granuloma formation. *Int Immunol* 19: 627-33, 2007.
265. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 7: 625-55, 1989.
266. Stenger S. Immunological control of tuberculosis: role of tumour necrosis factor and more. *Ann Rheum Dis* 64 Suppl 4: iv24-iv28, 2005.
267. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 14: 397-440, 1996.
268. Hruska K PI. Crohn's disease and related inflammatory diseases: from many single hypotheses to one "superhypothesis". *Veterinarni Medicina* 59: 583-630, 2014.
269. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 178: 2243-7, 1993.

270. Saunders BM, Frank AA, Orme IM, Cooper AM. CD4 is required for the development of a protective granulomatous response to pulmonary tuberculosis. *Cell Immunol* 216: 65-72, 2002.
271. Pedersen J, Coskun M, Soendergaard C, Salem M, Nielsen OH. Inflammatory pathways of importance for management of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 20: 64-77, 2014.
272. Roderfeld M, Koc A, Rath T, Blocher S, Tschuschner A, Akineden O, Fischer M, von GS, Goethe R, Eckelt E, Meens J, Bulte M, Basler T, Roeb E. Induction of matrix metalloproteinases and TLR2 and 6 in murine colon after oral exposure to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbes Infect* 14: 545-53, 2012.
273. Zhu J, Mohan C. Toll-like receptor signaling pathways--therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm* 2010: 781235, 2010.
274. Netea MG, van d, V, Verschuieren I, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52: 118-23, 2008.
275. Ryffel B, Fremond C, Jacobs M, Parida S, Botha T, Schnyder B, Quesniaux V. Innate immunity to mycobacterial infection in mice: critical role for toll-like receptors. *Tuberculosis (Edinb)* 85: 395-405, 2005.
276. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13: 933-40, 2001.
277. Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Muhlradt PF, Akira S. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 164: 554-7, 2000.
278. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13766-71, 2000.
279. Marinho FA, de Paula RR, Mendes AC, de Almeida LA, Gomes MT, Carvalho NB, Oliveira FS, Caliri MV, Oliveira SC. Toll-like receptor 6 senses *Mycobacterium avium* and is required for efficient control of mycobacterial infection. *Eur J Immunol* 43: 2373-85, 2013.
280. Balaram P, Kien PK, Ismail A. Toll-like receptors and cytokines in immune responses to persistent mycobacterial and *Salmonella* infections. *Int J Med Microbiol* 299: 177-85, 2009.
281. Appelberg R. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* infection: typical responses to an atypical mycobacterium? *Immunol Res* 35: 179-90, 2006.
282. Gomes MS, Appelberg R. NRAM1- or cytokine-induced bacteriostasis of *Mycobacterium avium* by mouse macrophages is independent of the respiratory burst. *Microbiology* 148: 3155-60, 2002.

283. Ma X, Liu Y, Gowen BB, Graviss EA, Clark AG, Musser JM. Full-exon resequencing reveals toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease. *PLoS One* 2: e1318, 2007.
284. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12: 991-1045, 1994.
285. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296: 301-5, 2002.
286. Gibbs DF, Warner RL, Weiss SJ, Johnson KJ, Varani J. Characterization of matrix metalloproteinases produced by rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 1136-44, 1999.
287. Gibbs DF, Shanley TP, Warner RL, Murphy HS, Varani J, Johnson KJ. Role of matrix metalloproteinases in models of macrophage-dependent acute lung injury. Evidence for alveolar macrophage as source of proteinases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 1145-54, 1999.
288. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474: 307-17, 2011.
289. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 124: 521-36, 2003.
290. Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, Lepage P, Raedler A, Schreiber S. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis* 14: 968-76, 2008.
291. Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 35: 1075-81, 2000.
292. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 29: 990-6, 1988.
293. Russell RK, Wilson DC, Satsangi J. Unravelling the complex genetics of inflammatory bowel disease. *Arch Dis Child* 89: 598-603, 2004.
294. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 312: 95-6, 1996.
295. Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* 124: 1767-73, 2003.
296. Shanahan F. Crohn's disease. *Lancet* 359: 62-9, 2002.

12. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Datum

Unterschrift

13. Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Elke Roeb - Universitätsklinikum Gießen, Zentrum für Innere Medizin Schwerpunkt Gastroenterologie - für die Möglichkeit, meine Promotionsarbeit in Ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen und für die Unterstützung während dieser Zeit.

Danke auch an Herrn PD Dr. Martin Roderfeld und Dr. Yuri Churin für dessen Unterstützung, Einarbeitungen und die immer freundliche Betreuung. Weiterhin danke ich ihnen für die Unterstützung in jeglichen Belangen und die umfassende Hilfe während dieser Arbeit.

Ganz besonderen Dank möchte ich auch der Mitarbeiterin Annette Tschuschner widmen für ihre geduldige Einarbeitung in experimentelle Methoden (RNA-Isolierung, Zymographie, PCR, Kryoschnitte etc.).

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Roeb für die angenehme Zusammenarbeit.

Ein Dank möchte ich auch dem Bundesministerium für Bildung und Forschung-Zoonosenverbund ZooMAP für die Forschungsfördermittel und der AG Siegfried Weiss aus dem Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (Molekulare Immunologie) in Braunschweig für die gute Zusammenarbeit widmen. Danke auch für die starke Unterstützung aus Hannover: Prof. Dr. Ralph Goethe und Dr. Tina Basler aus dem Institut für Mikrobiologie (Zentrum für Infektionsmedizin) der TiHo, Prof. Dr. Mathias Hornef aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene sowie Herrn Dr. Gerald F. Gerlach (IVD GmbH).

Nicht zuletzt geht ein sehr großer Dank an meine Eltern, Meliha und Mustafa Koc, und meiner Familie für ihre Geduld und ihre Fürsorge. Ohne ihren festen Glauben an mich und ihre moralische Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.